

UNIVERSITATEA „BABES-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA
Facultatea de Biologie și Geologie

MIHAIL DRĂGAN-BULARDA

Microbiologie Generală

PENTRU UZUL STUDENȚILOR



LUCRĂRI PRACTICE

III 266.330

CLUJ-NAPOCA
2000

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU” IAȘI

III 266.330

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
CATEDRA DE BIOLOGIE VEGETALĂ

Prof. dr. MIHAIL DRĂGAN-BULARDA

277920

LUCRĂRI PRACTICE
DE
MICROBIOLOGIE GENERALĂ

Ediția a III-a



034868
B.C.U. - IASI

Pentru uzul studenților

CLUJ-NAPOCA, 2000



DR. INGHEL DRAGAN-BULARDA

LUCRARI PRACTICE

DE

MICROBIOLOGIE GENERALA

579

Microbiologie
L. pr.

27 MAR. 2002

CUPRINS

<i>Prefată</i>	5
1. Amenajarea și dotarea unui laborator de microbiologie	7
1.1. Localul laboratorului	7
1.2. Aparatura de laborator	7
1.3. Sticlăria de laborator	8
1.4. Materiale de laborator	10
1.5. Măsuri de protecția muncii în laboratoarele de microbiologie	10
2. Metode de sterilizare	12
2.1. Sterilizare prin agenți fizici	12
2.2. Sterilizarea prin agenți chimici	20
3. Mediile de cultură	22
3.1. Tehnica preparării mediilor de cultură pentru bacteriile aerobe	23
3.2. Tehnica preparării mediilor de cultură pentru bacteriile anaerobe	28
3.3. Medii speciale de cultivare	29
3.4. Medii pentru cultivarea ciupercilor (micromicetelor)	41
3.5. Medii pentru unele grupe fiziologice de microorganisme	42
3.6. Indicatori utilizați în microbiologie	46
4. Tehnica însămânțării microorganismelor	47
4.1. Însămânțarea cu pipeta Pasteur	47
4.2. Însămânțarea cu ansă	48
4.3. Însămânțarea prin întepare	49
4.4. Însămânțarea în cutii Petri	49
4.5. Însămânțarea din materialele patologice	50
5. Examenul caracterelor culturale ale microorganismelor	52
6. Tehnica izolării bacteriilor în culturi pure	55
6.1. Metoda diluțiilor succesive în medii lichide	55
6.2. Metoda diseminării produsului de studiat pe medii solide	55
6.3. Metoda asocierii diluțiilor succesive cu diseminarea produsului de studiat	55
6.4. Metode de izolare bazate pe acțiunea căldurii	56
6.5. Metode de izolare prin adaos de substanțe bacteriostatice	56
6.6. Metode de izolare și identificare bazate pe evidențierea anumitor proprietăți enzimatică	57
6.7. Metode de izolare și identificare utilizând medii cu un anumit pH	57
6.8. Metoda inoculării la animale receptivă	57
7. Examinarea caracterelor morfologice și tinctoriale ale microorganismelor	58
7.1. Examinarea microorganismelor în preparate native	58
7.2. Examenul în câmp întunecat	59
7.3. Examinarea microorganismelor pe preparate colorate	60

8. Determinarea dimensiunilor microorganismelor	66
8.1. Metoda comparării cu elemente de dimensiuni cunoscute	66
8.2. Metoda măsurării cu micrometrul ocular	66
9. Tehnica determinării numărului de bacterii dintr-un anumit produs	69
9.1. Metoda culturilor în plăci	69
9.2. Determinarea numărului celui mai probabil de bacterii	71
9.3. Metoda nefelometrică	73
10. Studiarea structurii celulare a microorganismelor	74
10.1. Evidențierea nucleului	74
10.2. Evidențierea vultinei	77
10.3. Evidențierea peretelui celular bacterian	79
10.4. Evidențierea capsulei bacteriene	80
10.5. Evidențierea cililor bacterieni	83
10.6. Evidențierea sporului bacterian	87
10.7. Evidențierea incluziunilor polizaharidice	89
10.8. Evidențierea incluziunilor lipidice	90
11. Examinarea caracterelor biochimice	91
11.1. Evidențierea proprietăților bacteriilor de a degrada glucide	91
11.2. Evidențierea proprietăților proteolitice ale bacteriilor	93
11.3. Evidențierea produsilor rezultați din descompunerea aminoacizilor	96
11.4. Testul de hidroliză a ureei	99
11.5. Evidențierea proprietăților reducătoare, ale altor proprietăți biochimice ale bacteriilor	100
11.6. Teste de cultivare pe medii care conțin substanțe asimilabile numai de anumite bacterii sau substanțe toxice la care numai unele bacterii sunt rezistente	106
11.7. Teste enzimatic	107
12. Studiul antagonismului microbial	113
13. Determinarea sensibilității microorganismelor la acțiunea unor substanțe antimicrobiene	115
13.1. Determinarea sensibilității microorganismelor la antibiotice (antibiograma)	115
13.2. Determinarea sensibilității la antibiotice a bacteriilor anaerobe	122
13.3. Determinarea concentrației antibioticelor în sânge și umori	123
13.4. Detectarea antibioticelor în lapte, alte alimente și furaje	126
13.5. Evaluarea în laborator a acțiunii dezinfectanților	128
14. Studiarea bacteriofagilor	132
14.1. Izolarea bacteriofagilor	132
14.2. Metode de punere în evidență a bacteriofagilor	133
14.3. Titrare bacteriofagilor	134
14.4. Tipizarea bacteriofagică	136

15. Reacțiile serologice (antigen-anticorp)	137
15.1. Reacția de precipitare	137
15.2. Reacția de aglutinare	141
15.3. Reacția de fixare a complementului	144
15.4. Determinarea indicelui opsonocitofagic	149
16. Metode utilizate în microbiologia solului	152
16.1. Descompunerea celulozei	152
16.2. Determinarea puterii amonificatoare a solului	153
16.3. Determinarea puterii nitrificatoare a solului în mediu lichid	155
16.4. Determinarea puterii denitrificatoare a solului în mediul lichid	157
16.5. Fixarea biologică a azotului molecular	158
16.6. Oxidarea sulfului în sol	161
16.7. Determinarea potasiului asimilabil din sol cu ajutorul lui <i>Aspergillus niger</i>	162
16.8. Transformarea microbiană a pesticidelor	165
16.9. Determinarea activității biologice globale a solului pe baza CO ₂ produs	167
16.10. Evidențierea bacteriilor din nodozitățile radiculare ale plantelor leguminoase	169
16.11. Evidențierea efectului de rizosferă	172
16.12. Determinarea activității catalazice a solului	175
16.13. Determinarea activității dehidrogenazice a solului	176
16.14. Determinarea activității fosfatazice a solului	178
16.15. Determinarea activității ureazice a solului	180
16.16. Determinarea activității zaharazice	183
16.17. Evidențierea unor oligaze și poliaze din sol	186
16.18. Determinarea activității proteazice a solului	189
16.19. Determinarea biomasei microbiene	192
16.20. Testul de reducere microbiană a fierului trivalent	197
16.21. Cultivarea microorganismelor parafinooxidante	198
16.22. Cultivarea bacteriilor producătoare de levane	200
16.23. Metode utilizate în cercetările de ecologie microbiană	203
17. Analiza bacteriologică a apei	218
17.1. Metode de analiză curentă	221
17.2. Metode de analiză complementară	232
18. Analiza microbiologică a aerului (determinarea aeroflorei)	251
18.1. Metode de determinare	251
19. Analiza microbiologică a cărnii și a preparatelor de carne	256
19.1. Determinarea numărului de germeni prin metoda directă	256
19.2. Detectarea bacteriilor din genul <i>Salmonella</i>	256
19.3. Detectarea bacteriilor coliforme	258
19.4. Detectarea bacteriilor din genul <i>Proteus</i>	258

19.5. Detectarea și numărarea stafilococilor coagulazo-pozitivi	259
19.6. Detectarea clostridiilor sulfitoreducătoare	260
20. Analiza microbiologică a laptelui și a produselor lactate	261
20.1. Recoltarea probelor pentru analiză	261
20.2. Determinarea numărului total de germeni	261
20.3. Determinarea numărului probabil al bacteriilor coliforme	262
20.4. Determinarea numărului de drojdii și mucegaiuri	263
20.5. Proba reductazei	265
20.6. Cultivarea bacteriilor lactice	267
20.7. Stabilirea numărului de bacterii lactice prin metoda numărătorii directe după Breed	269
20.8. Examinarea chimică a zerului	270
20.9. Determinarea calitativă a diacetilului și acetoiniei în culturile aromatizante	271
20.10. Tehnica dozării diacetilului din culturi prin metodamicrodifuziei	272
20.11. Determinarea conținutului în acizi volatili a culturilor lactice	273
2.12. Determinarea conținutului de CO ₂ din culturile lactice	274
21. Tehnici utilizate în biotehnologii	275
21.1. Metoda directă de numărare a drojdiilor, a sporilor de mucegaiuri cu ajutorul câmerei de numărat (Thoma)	275
21.2. Evidențierea fermentației alcoolice	276
21.3. Determinarea vitezei de înmulțire a drojdiilor în timpul fermentației alcoolice	278
21.4. Determinarea glicogenului în celule de drojdii	279
22. Metode de inducere și identificare a mutațiilor la microorganisme	280
22.1 Metode de inducere a mutațiilor cu radiații	280
22.2. Metode de inducere a mutațiilor cu substanțe chimice	283
22.3. Tehnici de obținere și fuziune a protoplastilor la microorganisme	286
23. Păstrarea și conservarea culturilor	288
23.1. Reinocularea periodică	288
23.2. Păstrarea în vase închise ermetic	288
23.3. Păstrarea în ulei mineral	288
23.4. Păstrarea prin liofilizare	288
23.5. Colectii de tulpini bacteriene	291
BIBLIOGRAFIE	291

PREFAȚĂ

Microbiologia, una dintre cele mai dinamice științe biologice, și-a marcat încă de la începuturile sale tendința de implicare în diferite domenii ale activităților umane, de a deschide orizonturi noi și altor ramuri ale biologiei.

Lucrarea de față are drept scop familiarizarea studenților cu practica microbiologică, aceștia însușindu-și tehnici specifice, metode de analiză ce duc la îmbogățirea cunoștințelor practice, legate de studierea microorganismelor, permițându-le să le folosească pentru cercetarea multiplelor aspecte, derivate din rolul deosebit de important pe care microorganismele îl au în natură

Domeniul microbiologiei fiind astăzi extrem de vast, am căutat să selectăm metodele de bază necesare pentru orice investigație cu caracter microbiologic, respectiv să introducem o serie de metode moderne care s-au impus în ultima perioadă de timp.

În prima parte a manualului sunt prezentate tehnicile de microbiologie generală, care se aplică pentru studierea microorganismelor în toate laboratoarele de microbiologie, acestea permițând să se asigure condițiile de asepsie necesare, să se cunoască metodele de cultivare, de studiere a caracterelor morfologice, a proceselor biochimice și fiziologice, a influenței factorilor fizici, chimici și biologici asupra microorganismelor. În partea a doua a manualului se prezintă metode și tehnici de lucru utilizate în ecologia microbiană, în microbiologia solului, în microbiologia acvatică, în biotehnologiile microbiene, acestea servind atât studenților cât și specialiștilor în realizarea unor cercetări microbiologice aplicative. Este de subliniat un merit al lucrării și anume acela că toate metodele descrise au fost verificate în laborator și ele pot fi transpuse în orice laborator studentesc, cu o dotare corespunzătoare.

Am reeditat lucrarea de față în primul rând din dorința de a fi utilă studenților care se inițiază în studiul microbiologiei ca obiect fundamental pentru biologi, dar și pentru specialiștii microbiologi sau biologi din laboratoarele de profil.

Pe această cale, țin să-mi reînnoiesc mulțumirile mele cele mai sincere adresate d-lui prof. univ. dr. Kiss Stefan, în calitate de referent oficial, pe lângă care m-am și format ca microbiolog, pentru sprijinul acordat, pentru sugestiile și observațiile pertinente referitoare la tehnicile descrise.

De asemenea, aduc cele mai calde mulțumiri și d-nei prof. univ. dr. Octăvița Ailiesei de la Universitatea "Al. I. Cuza" Iași care a binevoit să accepte a fi referent oficial, analizând lucrarea cu înaltă competență de specialist, fapt pentru care îi rămân adânc recunoscător.

Autorul rămâne deschis pentru îmbunătățirea manualului, așteptând sugestiile pe care cititorii, specialiștii vor avea amabilitatea să le facă.

1. AMENAJAREA ȘI DOTAREA UNUI LABORATOR DE MICROBIOLOGIE

1.1. Localul laboratorului.

Acesta trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- încăperea să fie luminoasă, fără a permite accesul unei lumini directe și puternice;
- să aibă pardoseala netedă (din mozaic sau parchet, acoperit cu linoleum) pentru a putea fi spălată și dezinfectată cât mai ușor;
- pereții să fie vopsiți în ulei sau îmbrăcați în faianță;
- încăperea să fie prevăzută cu rețea de gaz, apă și canal precum și cu un număr de prize electrice, după nevoi.

Mobilierul de uz curent al laboratorului trebuie să fie format din:

- a) mese de lucru, având suprafața acoperită cu plăci de faianță sau cu plăci de sticlă;
- b) scaune cu înălțimea reglabilă;
- c) dulapurile să fie simple, de obicei din metal și vor servi pentru păstrarea aparaturii, sticlăriei și chimicalelor.

Laboratorul de microbiologie va mai cuprinde și unele camere anexe, în funcție de posibilități:

- cameră de primire a materialelor;
- cameră pentru dezinfecția, spălarea, sterilizarea și pregătirea materialelor necesare (medii de cultură, sticlărie etc.);
- cameră specială pentru însămânțări.

1.2. Aparatura de laborator

Dintre aparatele care se folosesc în laborator amintim:

- microscopice de diferite tipuri cu accesoriile necesare;
- termostate, anaerostate pentru asigurarea condițiilor de cultivare a microorganismelor;

- autoclav, pentru sterilizarea mediilor nutritive și a altor materiale;
- etuve, pentru sterilizarea sticlăriei;
- frigidere, pentru păstrarea și conservarea culturilor microbiene și a mediilor de cultură;
- diverse aparate care se întrebuințează pentru executarea lucrărilor curente de laborator (balanțe farmaceutice, balanțe analitice, centrifuge, ultracentrifuge, agitatoare, băi de apă, ultratermostate, aparate de produs vid, aparate de filtrare, aparate pentru determinarea pH, aparate pentru electroforeză, aparate pentru cromatografie, microtoame, lămpi cu UV etc.).

1.3. Sticlăria de laborator

Aceasta este reprezentată prin:

- baloane cu fund plat (fig.1A)
- baloane Erlenmeyer de diferite mărimi (fig.1.B);
- baloane Fernbach, cu fund plat și gât lung, folosite pentru culturile în mediu lichid a bacteriilor care au nevoie de mult oxigen (fig.1 C).
- baloane cotate de diverse mărimi;
- baloane Kitasato, cu tub lateral, folosite la filtrări;
- borcane de sticlă mici și mari;
- baghete de sticlă;
- capsule de sticlă;
- cilindre gradate;
- clopote de sticlă;
- cristalizoare;
- cutii (plăci) Petri având diferite mărimi: 8, 10, 12, 20 cm diametru și 2-3 cm înălțime (fig.2A);
- cutii (plăci) Roux, având 21 cm lungime, 15 cm lățime și 4,5 cm înălțime (fig. 2B);
- eprubete de diferite mărimi (fig.3A));

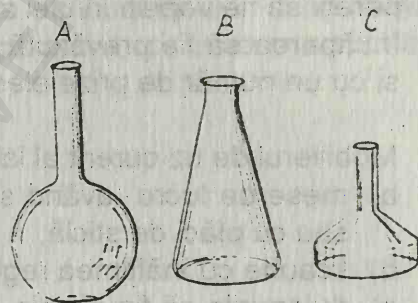


Fig.1 Tipuri de baloane:
A, balon cu fund plat; B. balon Erlenmeyer; C. balon Fernbach

- eprubete (tuburi) Wassermann (fig. 3B);
- eprubete Roux, cu o gâtuitură în porțiunea inferioară (fig. 3C);
- eprubete Weinberg (20 cm/1 cm), folosite pentru cultivarea bacteriilor anaerobe (fig.3 D);
- exicatori;
- fiole de diferite mărimi;
- lame microscopice;
- lamele;
- mojarie din sticlă cu pistil;
- pahare Borrel;
- pahare Berzelius;
- pahare conice gradate;
- perle de sticlă;
- pipete gradate;
- pipete Pasteur;
- pisete;
- pâlnii;
- sticle cu picurător pentru coloranți și reactivi;
- sticle de diferite mărimi;
- sticle cu dop rodat;
- sticle de ceas;
- tuburi de centrifugă;
- tuburi de fermentație Durham;
- țevă de sticlă fuzibilă pentru pipete Pasteur.

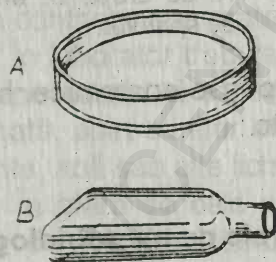


Fig.2. Cutie (placă) Petri (A) și cutie (placă) Roux (B).

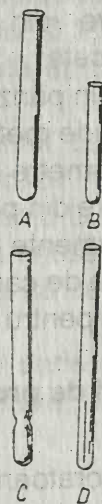


Fig.3. Tipuri de eprubete:

- a: eprubetă obișnuită;
- b: eprubetă (tub) Wassermann;
- c: eprubetă (tub) Roux;
- d: eprubetă Weinberg

1.4. Materiale de laborator

În această categorie intră:

- acele de platină sau firele de platină, care servesc pentru recoltarea în condiții sterile a materialului microbiologic în vederea însămânțării sau a executării preparatelor microscopice (fig. 4A); sunt alcătuite dintr-un fir de platină sau iridium fixat într-o tijă metalică;
- ansa de însămânțare, la care firul (acul) se termină printr-un inel (bucălă) (fig. 4B);
- ac spatulat, la care firul (acul) se termină printr-o porțiune lățită (fig.4C);
- becuri de gaz Bunsen sau Teclu;
- reșouri electrice;
- lămpi cu alcool;
- sterilizatoare electrice;
- coșuri de sârmă;
- pensete metalice;
- platină pentru încălzit (se folosește pentru colorarea la cald a preparatelor microscopice);
- tăvi de colorare;
- stative pentru colorare;
- stative din lemn sau metal pentru eprubete;
- site din pânză de azbest;
- trepiede metalice;
- termometre;
- mojarie din porțelan cu pistil;
- instrumente diferite ca: foarfeci, bisturie, pense anatomice, brice, sonde de cauciuc sau metalice, seringi etc.;
- găleți pentru materiale infectate.

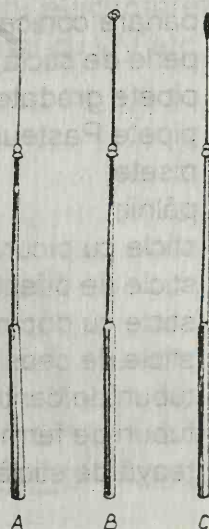


Fig.4. Ace de însămânțare

A. ac drept; B. ansă; C. ac spatulat.

1.5. Măsuri de protecția muncii în laboratoarele de microbiologie

În laboratoarele de microbiologie este absolut necesar să se țină seama de anumite norme privind securitatea muncii, în special în vederea evitării infecțiilor accidentale de laborator ca și a răspândirii unor microbi prin obiecte contaminate.

Personalul va purta în mod obligatoriu și în anumite situații, mască, ochelari de protecție, mănuși de cauciuc etc.

Pentru a se evita infestarea prin instrumentarul folosit (anse de însămânțare, ace spatulate, foarfeci, pensete, seringi etc.), manipularea acestuia se va face cu o foarte mare atenție. Se vor respecta condițiile de sterilitate prevăzute. Curățarea și spălarea instrumentelor se va face numai după o prealabilă sterilizare a acestora. Manipularea materialului infectat ca și a culturilor microbiene, a mediilor de cultură se face cu grijă, respectându-se normele de asepsie, lucrându-se la flacăra cu instrumente corespunzător sterilizate. Ansele de însămânțare, după utilizare, se vor steriliza prin încălzire la roșu de 3 ori succesiv și apoi se așează în stativ. Pipetele gradate sau pipetele Pasteur, după întrebuințare, se introduc în recipiente cu o soluție dezinfectantă [sublimat corosiv (HgCl_2) 0,1%, bicromat de potasiu 5%, amestec oxidant sulfocromic].

Culturile microbiene care nu mai sunt întrebuințate se adună în coșuri de sârmă sau vase emailate și se sterilizează în autoclav. Este interzisă spălarea acestora înainte de a fi sterilizate. Culturile microbiene care vor servi pentru studiu nu se lasă pe mese, ci se vor păstra fie în termostate, fie în dulapuri închise.

După terminarea lucrărilor, când se folosesc germeni patogeni, mesele se vor curăța cu soluții dezinfectante, ca sublimat corosiv 0,1%.

În cazul producerii unui accident, cum ar fi de exemplu: spargerea unor recipiente cu culturi microbiene patogene, imediat se acoperă suprafața infectată cu o soluție de sublimat corosiv 0,1% sau alt dezinfectant care se lasă 1-2 ore, după care se curăță mecanic și se mai dezinfectează cu soluție de bicromat de K 5%.

Dacă în timpul executării lucrărilor echipamentul de protecție vine în contact cu un material infectat, acesta se va steriliza în autoclav.

În laborator trebuie să se găsească în permanență la îndemână prosoape curate și săpun, precum și vase cu soluții antiseptice (apă oxigenată, spirt sanitar etc.). În laborator este interzis să se consume alimente, apă sau alte lichide.

În afară de cele arătate mai sus se vor lua o serie de măsuri legate de folosirea aparaturii și a substanțelor nocive, măsuri de protecție comune și pentru alte laboratoare.

2. METODE DE STERILIZARE

Microorganismele sunt răspândite pretutindeni în natură: aer, apă, sol, pe suprafața corpului viețuitoarelor, pe toate obiectele pe care le manipulăm, instrumente, sticlărie etc. Datorită acestui fapt, în cercetările de microbiologie este necesar să se asigure de la început sterilitatea materialului de laborator și a aparaturii cu care se lucrează. Pentru studierea unui microorganism este necesară izolarea acestuia în cultură pură, pe medii de laborator. Toate operațiile executate în vederea studierii microorganismelor trebuie realizate în mod aseptice, iar însămânțările efectuate pentru izolarea acestora se fac în medii sterile și în condiții de sterilitate.

Prin *steril* în microbiologie se înțelege lipsa totală a oricăror microorganisme de pe suprafața și din interiorul obiectelor, dintr-un spațiu sau de pe o suprafață dată. Această condiție este asigurată prin operațiunea numită *sterilizare* și constă în distrugerea sau îndepărtarea totală a microorganismelor. Sterilizarea poate fi realizată cu ajutorul agenților fizici și chimici.

2.1. Sterilizarea prin agenți fizici

Dintre agenții fizici cu acțiune sterilizantă cei mai importanți sunt: căldura uscată, căldura umedă, razele ultraviolete și ultrasunetele.

2.1.1. Sterilizarea prin căldură uscată

Căldura uscată acționează distrugător asupra microorganismelor, producându-se coagularea proteinelor sau carbonizarea microorganismelor. Sterilizarea prin căldură uscată poate fi realizată prin mai multe procedee:

2.1.1.1. Sterilizarea prin flambare

Constă în trecerea obiectului de sterilizat prin flacăra unui bec de gaz sau a unei lămpi cu alcool, odată sau de mai multe ori timp de câteva secunde. Prin acest procedeu se sterilizează pipetele Pasteur și pipetele gradate (numai suprafața exterioară) în momentul folosirii, gura baloanelor și a eprubetelor înainte și după întrebuințare.

2.1.1.2. Sterilizarea prin încălzire la roșu

Se sterilizează prin acest procedeu obiectele metalice folosite în tehnicile microbiologice (anșele de însămânțare, acele spatulate). Acestea se țin în flacără până la înroșirea lor (fig.5).



Fig.5. Sterilizarea ansei prin încălzire la roșu

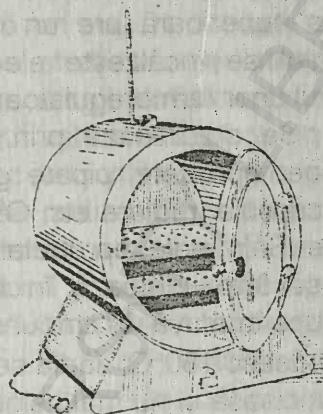


Fig.6. Sterilizator electric cu aer cald. Etuvă.

2.1.1.3. Sterilizarea prin aer cald

Aerul încălzit la 160° - 180° în decurs de 1 oră distruge toate microorganismele. Acest mod de sterilizare se realizează în etuve (cuptor Pasteur, Poupinel) (fig.6). Etuva este o cutie metalică (de obicei

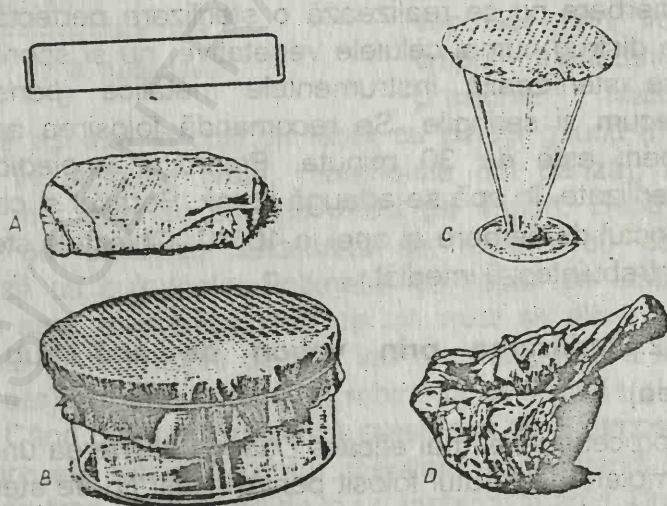


Fig.7. Pregătirea materialelor pentru sterilizată prin aer cald: A. cutie Petri; B. cristalizor; C. vas conic; D. mojar cu pistil

din aramă), cu pereții dubli, separați printr-o pătură de aer care se încălzește în momentul funcționării. La exterior aparatul este izolat cu plăci de azbest pentru a împiedica pierderea de căldură. În interior se găsesc rafturi din tablă pe care se așează materialele de sterilizat. În partea superioară are un orificiu în care se introduce termometrul. Aparatul se încălzește electric și reglarea temperaturii se face cu ajutorul unor termoregulate.

Se sterilizează prin aer încălzit *toată sticlăria* de laborator: baloane, eprubete, pipete gradate, pipete Pasteur, cutii Petri, pâlnii, fiole, capsule, mojar etc. Obiectele de sterilizat trebuie să fie curate și uscate. Baloanele, eprubetele și pipetele se închid cu dopuri de vată și apoi se împachetează în hârtie (fig.7). Sticlăria astfel pregătită se introduce în etuvă. În timpul sterilizării hârtia albă devine galbenă. Dacă se depășesc 180°C, hârtia se brunifică (se carbonizează parțial), devine sfărâmicioasă și nu mai asigură sterilitatea obiectelor în timpul păstrării, până în momentul folosirii. Obiectele sterilizate pot fi păstrate timp de 1-2 săptămâni în dulapuri bine închise.

2.1.2. Sterilizarea prin căldură umedă

Căldura umedă, în comparație cu cea uscată, are o putere de penetrație mai mare, distrugând microorganismele hidratate, într-un timp mai scurt și la o temperatură mai joasă.

2.1.2.1. Sterilizarea prin fierbere

Prin fierbere nu se realizează o sterilizare perfectă (completă) deoarece se distrug numai celulele vegetative, nu și sporii. Prin acest procedeu se sterilizează instrumentele metalice (pense, foarfeci, bisturie), precum și seringile. Se recomandă folosirea apei distilate. Durata fierberii este de 30 minute. Pentru a împiedica ruginirea obiectelor sterilizate, în apă se adaugă borax. Boraxul și carbonatul de Na ridică punctul de fierbere al apei la 105°C. Obiectele sterilizate prin fierbere se întrebuințează imediat.

2.1.2.2. Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune (autoclavarea)

Este procedeul cel mai eficace. Duce la obținerea unei sterilizări perfecte (complete). Aparatul folosit pentru acest tip de sterilizare este *autoclavul* (fig.8). Autoclavul este un cazan metalic, cu pereți groși care

rezistă la o presiune de cel puțin 3 atmosfere. Autoclavele mici se încălzesc direct și vaporii de apă se produc chiar în interiorul cazanului. Partea inferioară a autoclavului este încălzită cu o flacără puternică dată de un arzător de gaz metan. Încălzirea se poate face și cu curent electric. În interiorul cazanului se așează un suport pe care se pun obiectele destinate sterilizării. Înainte de sterilizare se introduce în autoclav apă, în așa fel ca nivelul ei să nu atingă platforma pe care se așează materialele de sterilizat. Autoclavul este prevăzut cu un capac metalic greu, cu o garnitură de cauciuc sau azbest, care poate fi înșurubat cu buloane metalice pentru a se realiza o închidere cât mai etanșă. Ca anexe, autoclavul are un manometru care indică presiunea vaporilor din interior, un robinet pentru vaporii și o supapă de siguranță. Aceste anexe comunică cu interiorul cazanului printr-un tub metallic.

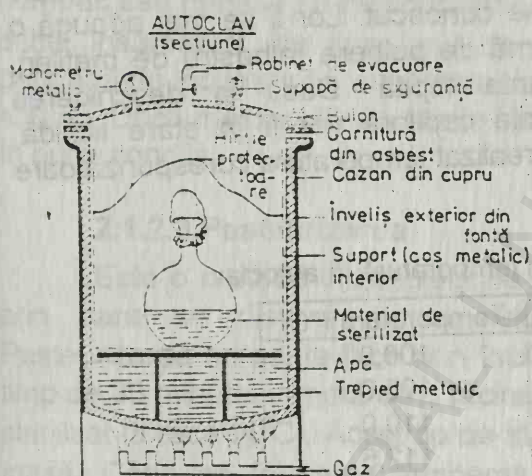


Fig.8. Autoclavul

Prin autoclavare se sterilizează majoritatea mediilor de cultură, aparatele din sticlă cu garnituri de cauciuc, halate, vata, serul fiziologic, infectele, recipientele contaminate care au servit la cultivarea sau manipularea microbilor.

Baloanele cu medii nutritive se închid cu dopuri de vată și apoi se leagă cu hârtie pentru a evita pătrunderea vaporilor prin vată, care în timpul sterilizării sunt sub presiune. Materialele de

sterilizat se așează în cutii de tablă cu pereții găuriți (medii nutritive, infectele), în cazolette (vata, materialele din pânză), iar vasele și baloanele mai mari se așează direct pe suport. După introducerea obiectelor de sterilizat, autoclavul se închide cu capacul și se înșurubează cu buloanele. Robinetul de vaporii se lasă deschis. Se încălzește apoi autoclavul până ce tot aerul se elimină din interiorul autoclavului (când vaporii de apă ies continuu, fără a fi întreruși de goluri de aer). În acest moment, robinetul se închide și încălzirea se continuă. Când manometrul indică presiunea de o atmosferă, sistemul de încălzire se reglează pentru menținerea constantă a acesteia o perioadă de timp, care diferă de la un material la altul. Unei presiuni de $\frac{1}{2}$ atmosferă îi corespunde o temperatură de 112°C , uneia de o

atmosferă îi corespunde o temperatură de 121°C, iar unei presiuni de 2 atmosfere îi corespunde o temperatură de 132°C (pe baza principiului proporționalității între punctul de fierbere al lichidelor și presiunea sub care acestea se găsesc; vezi și tabelul 1). În mod obișnuit, autoclavarea se face la 121°C timp de 30 de minute, care asigură o sterilizare perfectă.

După terminarea sterilizării, încălzirea se întrerupe. Robinetul de vapori se deschide, ducând la scăderea presiunii interne. Capacul se deschide numai după ce presiunea internă devine egală cu cea externă.

Pentru controlul temperaturii din interiorul autoclavului, în afară de manometru se mai pot folosi și anumite substanțe (ca probe de supracontrol) care se introduc în tuburi capilare de sticlă. Aceste substanțe au punctul de topire bine cunoscut. Lor li se mai adaugă o cantitate mică de colorant sub formă de pulbere (albastru de metilen, fucsina) care va colora substanța topită. Dacă la deschiderea autoclavului substanțele din tuburile capilare vor fi în stare lichidă, înseamnă că în cursul sterilizării s-a realizat temperatura corespunzătoare punctului lor de topire.

Tabelul 1.

Relatia dintre presiune și temperatură în autoclav

Presiunea (atm)	Temperatura (°C)
0,0	100,0
0,2	105,0
0,4	110,0
0,5	112,5
0,6	114,5
0,8	117,0
1,0	121,0
1,2	124,0
1,4	126,0
1,5	127,0
1,8	130,0
2,0	132,0

Amințim câteva substanțe folosite în acest scop și punctul de topire corespunzător:

acidul oxalic	101°C
benzonafтолul	110°C
sulfur	115°C
chinina	116°C
acidul benzoic	121°C
ureea	132°C

Controlul temperaturii se mai poate face și cu ajutorul unor termometre de 200-300°C.

Controlul sterilității se face prin teste biologice. În acest scop se folosesc culturi sporulate care rezistă la temperaturi ridicate (culturi sporulate de *Bacillus anthracis*, rezistente la 115°C și culturi de *Bacillus stearothermophilus* rezistente la 121°C timp de 5 minute, iar la 130°C timp de 1 minut). Sterilizarea este eficientă dacă înșămânțarea sporilor după autoclavare nu este urmată de creșterea bacteriilor rezultate din germinarea sporilor. În practică se întrebuițuează fire uscate de bumbac sau mătase îmbibate în prealabil cu cultură sporulată și închise apoi într-un tub de sticlă steril. Aceste tuburi de sticlă conținând culturile sporulate se introduc în autoclav odată cu materialele de sterilizat. După terminarea autoclavării, tuburile de sticlă se sparg iar firele de bumbac sau mătase se introduc într-un mediu de cultură. Acest mediu, astfel înșămânțat, se ține timp de 48 ore la 37°C. După această perioadă de incubare se urmărește dacă a avut loc creșterea bacteriilor sau nu. Dacă mediile rămân sterile înseamnă că sterilizarea s-a realizat în bune condiții.

2.1.2.3. Pasteurizarea

Este o metodă incompletă de sterilizare, imaginată de Pasteur, prin care se distrug numai celulele vegetative, nu și spori. Pasteurizarea se poate face prin încălzire la temperatura de 60-65°C, timp de 30 minute, urmată de o răcire bruscă și menținerea materialului sterilizat la rece (4°C). Acest tip de sterilizare se numește *pasteurizare joasă*. Când se folosește temperatura de 70-75°C, timp de 10-20 minute se realizează o *pasteurizare medie*. Dacă lichidele supuse pasteurizării sunt aduse într-un strat subțire în contact cu suprafețe încălzite la 85-90°C timp de câteva secunde, se realizează o *pasteurizare înaltă*.

Încălzirea are drept scop distrugerea celulelor vegetative, iar răcirea bruscă și menținerea în continuare la rece împiedică germinarea sporilor. Această metodă se aplică lichidelor supuse unei alterări rapide și se folosește în mod curent în industria laptelui.

2.1.2.4. Tindalizarea

Este o metodă de sterilizare fracționată, preconizată de Tyndall în 1877 și se utilizează pentru substanțele care se denaturează la temperaturi ridicate. Constă în încălzirea discontinuă, timp de 30-60 minute, la intervale de 24 ore în trei zile consecutive. Tindalizarea se

realizează la temperatura suportată de materialele respective. Astfel, mediile cu ou, precum și serul coagulat se tindalizează la 70-80°C, iar mediile cu zaharuri la 100°C.

Prin încălzirea din ziua întâia se distrug formele vegetative ale bacteriilor, sporii rămânând viabili. După 24 de ore de păstrare a mediilor la temperatura camerei, sporii având condiții prielnice vor germina. În urma germinării sporilor rezultă celule vegetative care vor fi distruse de încălzirea din ziua a doua. Încălzirea din ziua a treia se face cu scopul de a distruge și eventualele celule vegetative rezultate din germinarea mai încheată a unor spori. Această încălzire este de fapt, mai mult o probă de control.

2.1.3. Sterilizarea prin raze ultraviolete

Razele ultraviolete (UV) distrug celulele vegetative, dar au o acțiune mai redusă asupra sporilor. Ca surse artificiale de UV se folosesc lămpi cu vapori de mercur. Se sterilizează, prin acest procedeu, aerul din laboratoarele de microbiologie, interiorul boxelor sterile, camerele de însămânțare.

2.1.4. Sterilizarea prin ultrasunete

Ultrasunetele sunt vibrații acustice (cu o frecvență de peste 20.000 Hz) care se obțin în aparate speciale ce permit trecerea unui curent alternativ de înaltă frecvență printr-un cristal de cuarț. Vibrațiile masei cristalului de cuarț, sub acțiunea impulsurilor electrice, duc la dezintegrarea rapidă a celulelor bacteriene.

2.1.5. Sterilizarea prin filtrare

Filtrarea constă în trecerea lichidelor printr-o substanță poroasă cu pori de dimensiuni mici care rețin majoritatea microorganismelor. Virusurile trec prin porii acestor filtre. Se sterilizează prin această metodă serul sanguin și alte lichide care se denaturează la cald. De asemenea, filtrarea se mai folosește și pentru separarea exotoxinelor de corpii microbieni din mediile de cultură.

Filtrarea nu trebuie considerată ca un simplu fenomen mecanic în care filtrul se comportă ca o sită ce nu lasă să treacă corpurile mai mari decât ochiurile rețelei sale, ci este un fenomen complex la baza căruia stă adsorbția particulelor din lichidul de filtrat de către pereții capilarelor care formează porii filtrului. Această adsorbție este determinată de vâscozitatea, temperatura și pH soluțiilor, de încărcătura electrică a particulelor și a filtrului.

Filtrele folosite pot fi de mai multe tipuri.

- a. *Filtre Chamberland*. Sunt confecționate din porțelan ars, având formă de bujii. Sunt notate cu L în funcție de dimensiunile porilor (L_1 - L_7). Dimensiunea porilor este invers proporțională cu mărimea cifrelor. Bacteriile sunt reținute în general de filtrul L_2 .
- b. *Filtre Berkefeld*. Sunt fabricate din pământ de infuzorii (Kieselgur). Au tot formă de bujii. Prezintă 3 grade de porozitate, notate prin literele W, N, V în funcție de mărimea porilor [wenig(ger.) = puțin; normal(ger.) = normal; viel(ger.) = mult].
- c. *Filtre Seitz*. Sunt fabricate din azbest. Au forma unor plăci fixate între două armături metalice. Plăcile filtrante sunt notate cu indicativele EK, EK_1 , EK_2 , în funcție de dimensiunile porilor. Plăcile filtrante EK_1 rețin bacteriile, iar cele EK_2 rețin și virusurile mari.
- d. *Filtre de sticlă*. Se confecționează din sticlă poroasă. Se prezintă sub forma unor plăci filtrante montate într-o pâlnie. Aceste filtre prezintă avantajul că nu modifică pH materialelor filtrate.
- e. *Membrane filtrante*. Se confecționează din diverse materiale cum sunt: colodiul, celuloza, gelatina, masele plastice etc. Se utilizează mai mult în virusologie și atunci când sunt necesari pori foarte mici (5-3000 nm).

Montrarea filtrelor

Filtrele se montează (se adaptează) la baloanele Kitasato (fig.9). Ele se fixează prin tubul ce se găsește la una din extremități, în dopul de cauciuc cu care se închide balonul. Tot sistemul se împachetează în hârtie și se sterilizează în autoclav (120°C) timp de 30 de minute. În momentul filtrării tubul lateral al balonului Kitasato, după ce se scoate dopul de vată, se adaptează la trompa de vid. Filtratul se recoltează într-un recipient steril.

Filtrele Chamberland și Berkefeld se pot folosi de mai multe ori, dacă după fiecare filtrare se face regenerarea lor prin spălări cu apă, cu diverse soluții saline și slab acide. Plăcile filtrante Seitz nu se întrebuintează decât o singură dată.

În timpul filtrării se vor respecta următoarele reguli:

- a). filtrul să nu prezinte crăpături care să permită trecerea microorganismelor reținute de porii peretelui filtrant;

b). lichidul care se filtrează să nu fie vâscos și să nu conțină particule mari în suspensie; pentru a se evita colmatarea membranelor filtrante lichidele organice vor fi diluate în prealabil cu ser fiziologic (soluție de NaCl 0,7%);

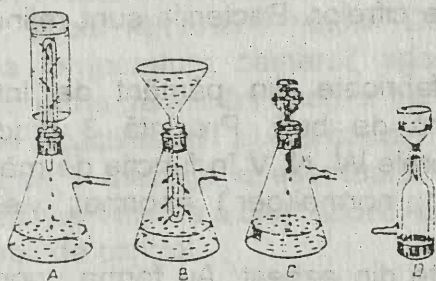


Fig.9. Montarea filtrelor. A. bujie filtrantă (Chamberland sau Berkefeld) montată exterior balonului Kitasato; B. bujie filtrantă (Chamberland sau Berkefeld) montată în interiorul balonului Kitasato; C. filtrul Seitz montat la balonul Kitasato; D. aparat de filtrare cu filtru de sticlă

c) presiunea exercitată asupra lichidelor de filtrat să nu depășească 30-40 mm Hg, la o durată a filtrării de 30 de minute;

d) filtrarea trebuie făcută într-un timp scurt, deoarece unele forme microbiene mici pot totuși forța porii filtrului, într-un timp mai îndelungat;

e) trebuie evitate variațiile bruște de presiune sau depresiune pentru că acestea determină o

colmatare a porilor membranei filtrante și o scădere sau oprire a debitului de filtrare.

Filtratele obținute, înainte de a fi folosite, trebuie verificate din punctul de vedere al sterilității lor. În acest scop, din filtrat se fac însămânțări pe medii de cultură aerobe și anaerobe, după o incubare de 48 de ore la 37°C, ele trebuie să rămână sterile, dacă filtrarea s-a desfășurat în condiții bune.

2.2. Sterilizarea prin agenți chimici

Pentru sterilizarea prin agenți chimici este folosit în special termenul de dezinfecție. Ea are drept scop distrugerea germenilor patogeni în vederea înlăturării posibilităților de infecție. Amintim următorii agenți chimici sterilizanți de uz curent:

- soluția de sublimat corosiv 0,1% folosită pentru dezinfecția meselor, mobilierului din sticlă și faianță, pentru dezinfecția mai riguroasă a mâinilor;
- soluția de bicromat de K 5% - pentru dezinfecția pipetelor întrebuințate;
- alcoolul etilic 70° - pentru dezinfecția curentă a mâinilor;

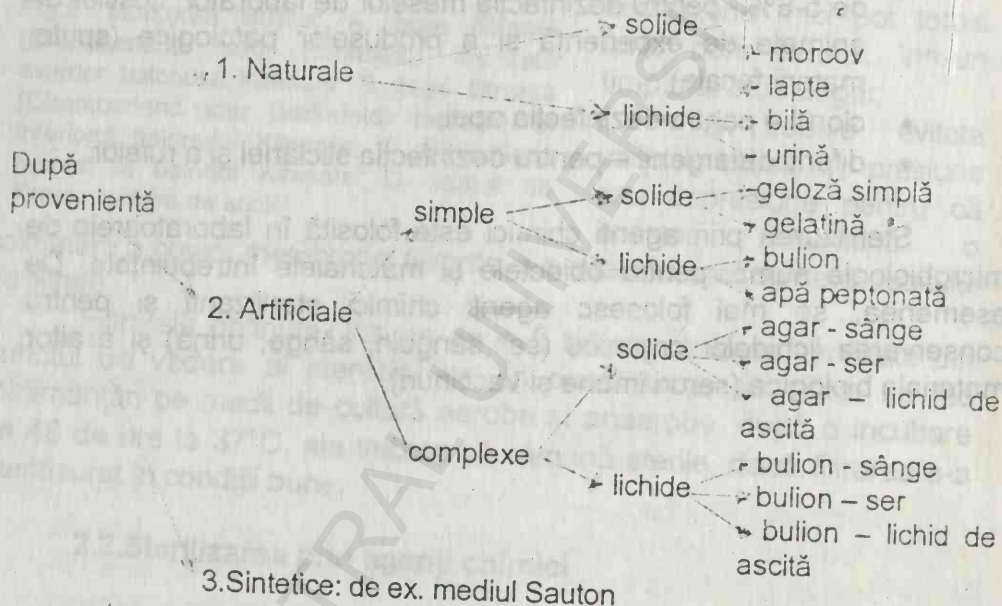
- formolul 40%, în concentrație de 5%, se utilizează pentru dezinfectia obiectelor din sticlă, faianță, metal etc.;
- apa oxigenată în concentrație de 3% - pentru dezinfectia mâinilor și mucoaselor;
- soluția de permanganat de K 0,1% - pentru dezinfectia mucoaselor
- soluția de hidroxid de Na 20% - pentru sterilizarea mobilierului și dușumelei;
- tinctură de iod – pentru dezinfectia locurilor de puncție;
- cloramina 1% - pentru dezinfectia mâinilor, iar în concentrație de 5-6% - pentru dezinfectia meselor de laborator, cuștilor de animale de experiență și a produselor patologice (spute, materii fecale);
- clorul – pentru dezinfectia apei;
- diferiți detergenți – pentru dezinfectia sticlăriei și a rufelor.

Sterilizarea prin agenți chimici este folosită în laboratoarele de microbiologie numai pentru obiectele și materialele întrebuințate. De asemenea, se mai folosesc agenți chimici sterilizanți și pentru conservarea lichidelor organice (ser sanguin, sânge, urină) și a altor materiale biologice (seruri imune și vaccinuri).

3. MEDIILE DE CULTURĂ

În vederea izolării, creșterii și înmulțirii microorganismelor, precum și pentru studierea proprietăților lor morfologice, culturale și biochimice se folosesc diverse produse sau extracte naturale sau artificiale pe care le numim medii de cultură. Se cunoaște un număr destul de mare de medii de cultură care se pot clasifica pe baza următoarelor criterii: proveniență, compoziție, scopul pentru care se folosește mediul, prezența sau absența O_2 .

A.



B. După compoziție:

- medii albuminoase (de ex.: mediul Dorset);
- medii zaharate (de ex. mediul Drigalski);

C. După scopul pentru care se întrebuintează mediile se împart în:

- medii de izolare (de ex. bulionul, geloza, apa peptonată etc.)
- medii de diagnostic (de ex. mediul Drigalski, mediul Endo etc.);
- medii de conservare (mediul cu ou Dorset), mediul cu agar moale etc.);
- medii de îmbogățire (permit dezvoltarea germenilor patogeni și inhibă dezvoltarea germenilor saprofiți);
- medii de selecție (de ex. mediul Löffler folosit pentru izolarea lui *Corynebacterium diphtheriae*).

D. În funcție de prezența sau absența O_2 : medii pentru microorganismele aerobe, respectiv pentru cele anaerobe.

Un mediu de cultură trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- a) să ofere microorganismului substanțe nutritive specifice (o sursă de carbon, o sursă de azot, elementele anorganice care se găsesc în cenușa speciei respective, factori de creștere);
- b) să aibă un anumit grad de aciditate sau alcalinitate;
- c) prezența O_2 în cazul germenilor aerobi și absența acestuia în cazul celor anaerobi;
- d) să fie steril;
- e) să fie clar, limpede pentru a permite studiul caracterelor culturale.

3.1. Tehnica preparării mediilor de cultură pentru bacteriile aerobe

3.1.1. Prepararea mediilor de cultură naturale

a). *Mediul cu cartof*. Se aleg cartofi de bună calitate din care se scot bucăți cilindrice. Cilindrii obținuți se curăță de coajă și se secționează pe diagonală. Aceste felii obținute se spală cu apă și se țin în continuare 3-24 ore într-un vas cu $NaHCO_3$ de 1% pentru neutralizare, întrucât au o reacție slab acidă. Fiecare felie se introduce apoi într-un tub Roux sau în alte recipiente. Se toarnă apoi peste acestea bulion glicerinat 5%, în așa fel ca partea inferioară a cartofului să fie umectată în permanență cu bulionul glicerinat. Mediul se sterilizează la $110^\circ C$, 20 de minute. Se folosește pentru studierea pigmentogenezei sau pentru întreținerea în laborator a culturilor de micobacterii.

b). *Mediul cu lapte*. Laptele obișnuit se repartizează în eprubete curate și se sterilizează la $110^\circ C$, 20 de minute.

c). *Mediul cu bilă*. Bila filtrată se repartizează în eprubete și se sterilizează la $115^\circ C$, 20 de minute.

d). *Extractul de sol*. La 1000 g sol fertil se adaugă 1000 ml apă de robinet. Amestecul se autoclavează la $120^\circ C$, 30 de minute. În continuare se adaugă 0,5 g $CaCO_3$ pentru a flocliza coloizii. Se agită și se filtrează la cald prin hârtie de filtru dublă. Filtratul inițial nu este clar, dar se continuă filtrarea până se obține un filtrat clar. Acesta din urmă se repartizează în baloane și se sterilizează la $112^\circ C$, 20 de minute. pH-ul extractului de sol trebuie să fie în jur de 7.

3.1.2. Prepararea mediilor de cultură artificiale

3.1.2.1. Prepararea mediilor uzuale lichide

Bulionul de carne, reprezintă mediul de bază în microbiologie. Prepararea lui se realizează în două etape:

a). *Prepararea maceratului de carne (zemii de carne)*

b). *Prepararea bulionului propriu-zis.*

a). *Prepararea maceratului de carne (zemii de carne).* Carnea proaspătă (inimă de bovine) se curăță de tendoane, aponevroze și grăsime și se trece prin mașina de tocat carne. Apoi la 500 g material tocat se adaugă 1000 ml apă de robinet. Se ține 24 de ore la rece pentru macerare. În acest interval de timp se realizează autoliza țesuturilor și solubilizarea produșilor de autoliză în apă. În continuare, se fierb 30 de minute pentru a intensifica dizolvarea substanțelor solubile și a coagula proteinele insolubile. După răcire se stoarce amestecul printr-o bucată de pânză groasă sau tifon dublu. Se filtrează apoi prin hârtie de filtru sau vată pentru a opri grăsimile. Filtratul obținut constituie zeama de carne. Aceasta se repartizează în baloane mari, spălate și sterilizate care se închid cu dopuri de vată, învelite în tifon. Se sterilizează 30 de minute la 120°C. Zeama de carne astfel pregătită se poate păstra timp îndelungat la rece și întuneric, servind la prepararea mediilor lichide și solide.

b) *Prepararea bulionului propriu-zis.* La 1000 ml zeamă de carne se adaugă 10 g peptonă și 5 g NaCl. Se amestecă și se încălzește până la dizolvarea completă a peptonei. Se lasă să se răcească, apoi se determină pH-ul. Se ajustează pH-ul la 7,5-7,8 cu ajutorul unei soluții de NaOH 10%. Apoi mediul se autoclavează timp de 15 minute la 120°C pentru precipitarea sărurilor alcalino-pământease. Pentru îndepărtarea precipitatului și a resturilor de grăsimi mediul se filtrează prin hârtie de filtru, după care se repartizează în baloane sau eprubete. Acestea se închid cu dopuri de vată și se sterilizează în autoclav la 120°C, 30 de minute.

Apa peptonată. În 1000 ml apă distilată se dizolvă, la cald, 10-20 g peptonă și 5 g de NaCl. Se ajustează pH-ul la 7,8-7,9. Se filtrează prin hârtie de filtru. Se repartizează în baloane sau eprubete și după ce s-au închis cu dopuri de vată se sterilizează 30 de minute la 120°C.

Bulionul glucozat. Se prepară pornind de la bulionul propriu-zis, la care se adaugă glucoză în proporție de 0,5-1%. Sterilizarea se face prin tindalizare, la 100°C, 30 de minute, 3 zile consecutiv.

Bulionul glicerinat. La bulion se adaugă glicerol în proporție de 1%, respectiv 5%. Sterilizarea se face la 110°C, 20 de minute.

3.1.2.2. Prepararea mediilor uzuale solide

Geloza simplă sau bulion – agar

La 1000 ml bulion se adaugă 20 g agar-agar (fibre, tăiate în bucăți mici). Fibrele de agar-agar sunt lipsite de proprietăți nutritive, ele servind numai pentru solidificarea mediului. Agarul este o substanță celoidală hidrofیلă (un polizaharid) extrasă din alge roșii, cum ar fi de exemplu *Gelidium corneum*. Constituentul principal este esterul sulfuric al galactanului linear capabil să formeze un gel apos care nu este atacat de marea majoritate a bacteriilor, care rămâne solid până la circa 90°C. Când se încălzește cu exces de apă până la 100°C, agarul formează un sol (se lichefiază=topește), solidificându-se la 45°C. Diferitele tipuri de agar diferă în ceea ce privește proprietățile fizice, chimice și biologice, în funcție de sursa originală și de tratamentele la care au fost supuse.

Bulionul împreună cu fibrele de agar-agar se încălzește fie pe baia de apă, până la lichefierea completă a fibrelor de agar-agar, fie în autoclav la 120°C, 30 de minute. Apoi se filtrează prin vată, la cald, eventual în autoclavul deschis. Filtratul se repartizează în eprubete sau baloane, care după ce se închid cu dopuri de vată se sterilizează în autoclav la 120°C, 30 de minute. Geloza nutritivă este transparentă, de culoare gălbuie. Se folosește sub formă de geloză înclinată în tuburi sau turnată în cutii Petri (fig.10 și fig.11). Mediul preparat nu se poate păstra mult timp în laborator, deoarece prin evaporare se usucă.

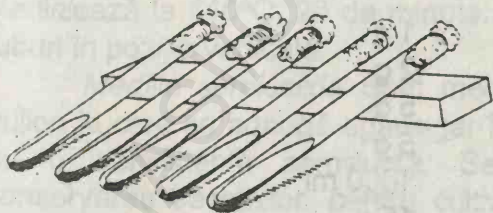


Fig.10. Poziția eprubetelor cu geloză înclinată pentru solidificare

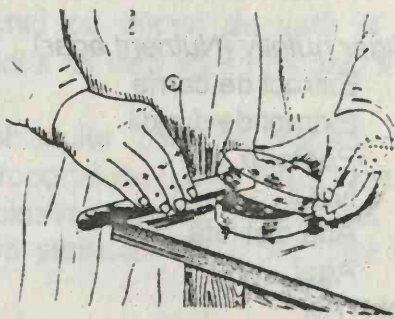


Fig.11. Turnarea gelozei nutritive în cutia Petri

Catalog Merck

Bulion nutritiv (Nährbouillon=Nutrient broth)

Extract de carne	3 g
Peptonă din carne	5 g
Apă distilată	1000 ml

pH=7,2

Sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C.

Agar nutritiv (Nähragar=Nutrient agar)

Extract de carne	3 g
Peptonă din carne	5 g
Agar	12 g
Apă distilată	1000 ml

pH=7,2

Sterilizare 15 minute la 121°C.

Catalog Oxoid

Bulion nutritiv (Nutrient broth)

Extract de carne	1 g
Extract de drojdii	2 g
Peptonă	5 g
NaCl	5 g
Apă distilată	1000 ml

pH=7,2

Sterilizare 15 minute la 121°C.

Agar nutritiv (Nutrient agar)

Extract de carne	1 g
Extract de drojdii	2 g
Peptonă	5 g
NaCl	5 g
Apă distilată	1000 ml
Agar	15 g

pH=7,2

Sterilizare 15 minute la 121°C.

Catalog Difco

a. *Bulion nutritiv (Nutrient broth)*

Extract de carne	3 g
Peptonă	5 g
Apă distilată	1000 ml

pH=7

Sterilizare 15 minute la 121°C.

b. *Bulion nutritiv (Nutrient broth)*

Extract de carne (Bacto beef extract Difco)	3 g
Apă distilată	1000 ml

pH=6,9

Sterilizare 15 minute la 121°C.

Agar nutritiv (Nutrient agar)

Extract de carne (Bacto beef extract)	3 g
Apă distilată	1000 ml
Agar	15 g

pH circa 7,0

Sterilizare 15 minute la 121°C.

Mediul cu gelatină

La 1000 ml bulion încălzit la 80°C se adaugă 120-150 g gelatină foi. Se agită până la lichefierea gelatinei. Când gelatina este complet lichefiată (nu trebuie să se depășească temperatura de 80°C), se alcalinează cu NaOH 10%, apoi se lasă să se răcească la 55°C. În acest moment se adaugă un albuș de ou dizolvat în 10-20 ml apă distilată. Mediul împreună cu albușul de ou se agită puternic. Se autoclavează apoi 30 de minute, la 115°C. Se filtrează și se repartizează în tuburi. Tuburile se închid cu dopuri de vată și se sterilizează la 110°C, 20 de minute. Mediul se lasă să se răcească în tuburi în poziție verticală.

Mediile semisolide Sunt medii obișnuite, care se prepară din bulion la care se adaugă agar-agar în proporție de 0,5%. Aceste medii au o consistență semifluidă. Se folosesc pentru cultivarea și conservarea bacteriilor, pentru cultivarea stafilococului producător de toxină etc.

3.2. Tehnica preparării mediilor de cultură pentru bacteriile anaerobe.

Germenii anaerobi se pot cultiva și pe mediile uzuale folosite pentru germenii aerobi, dacă se elimină oxigenul, prin introducerea recipientelor în anaerostat.

În practică se folosesc mai frecvent două medii pentru cultivarea bacteriilor anaerobe: bulionul cu ficat și carne și geloza Veillon.

Bulionul cu ficat și carne. Compoziția mediului este următoarea:

Ficat de vițel	250 g
Carne de vițel	250 g
Apă de robinet	1000 ml

Ficatul și carnea tocată mărunt se amestecă cu apa și se fierb aproximativ 20 de minute. Se filtrează apoi prin tifon. Amestecul de ficat și carne rămas pe tifon se spală de 4-5 ori cu apă distilată și se usucă într-o bucată de pânză curată. Sub această formă se repartizează în tuburi sterile, în cantitate de 3 g/tub.

Lichidul rezultat la filtrare se completează cu apă de robinet până la volumul inițial de 1000 ml. Apoi la acesta se adaugă:

Peptonă tripsică	15 g
NaCl	5 g

Amestecul se încălzește până la dizolvarea acestor ingrediente, după care se ajustează pH la 8. Se autoclavează 20 de minute la 120°C. Se adaugă glucoză în proporție de 2%. Se filtrează prin hârtie de filtru. Din filtrat se repartizează câte 6 ml în tuburile care conțin 3 g amestec de carne și ficat. În fiecare tub se mai aduagă și 2 ml ulei de vaselină steril. Se sterilizează prin autoclavare la 115°C, timp de 15 minute sau prin tindalizare la 100°C (autoclavul cu capacul neînșurubat) timp de 30 de minute, în 3 zile consecutive. Adăugarea uleiului de vaselină nu este obligatorie. Dar în caz că nu s-a adăugat ulei, mediul trebuie fiert înainte de întrebuințării, pentru îndepărtarea oxigenului.

Geloza Veillon. Are următoarea compoziție:

Bulion	1000 ml
Glucoză	10 g
KNO ₃	1 g
Agar-agar	10 g

Se dizolvă glucoza și azotatul de K în bulion. Se adaugă agar-agarul. Se încălzește până la lichefierea agarului. Se filtrează prin vată. Se repartizează în tuburi Weinberg, în așa fel ca mediul să ocupe mai

mult de jumătate din înălțimea tubului. După închidere cu dopuri de vată, tuburile se sterilizează la 115°C, timp de 15 minute.

Azotatul de K, care se adaugă mediului, are drept scop să împiedice fragmentarea mediului datorită gazelor produse în cursul metabolismului bacterian. CO₂ și H₂ care se produc în cursul acestui metabolism sunt transformate în K₂CO₃ și H₂O în prezența KNO₃.

3.3. Medii speciale de cultivare

Aceste medii se întrebuintează pentru cultivarea speciilor care nu se dezvoltă pe medii uzuale, fiind mai pretențioase din punctul de vedere al necesităților nutritive.

Bulion-ser. La bulionul propriu-zis se adaugă ser de cal (sau ser de bou, de iepure, de berbec, de om) steril în proporție de 1:5. Operațiunea se efectuează în condiții de sterilitate.

Geloză-ser. La geloza lichefiată și răcită la 45-50°C se adaugă ser de cal steril în proporție de 1:5. Pentru omogenizarea amestecului, tuburile se agită cu grijă, apoi se lasă să se răcească în poziție înclinată.

Geloză-sânge. La geloza lichefiată și răcită la 45-50°C se adaugă sânge defibrinat de oaie sau de om, în proporție de 1 ml sânge la 9 ml mediu. Se agită ușor eprubetele pentru omogenizare. Eprubetele cu mediu fie că se lasă la solidificat în poziție înclinată, fie că mediul se toarnă în cutii Petri sterile.

Mediul cu ou Dorset. Conținutul ouălor se amestecă în condiții de sterilitate cu apă distilată sterilizată în proporție de 10% sau cu ser fiziologic în proporție de 1:3. Ouăle folosite, în prealabil sunt spălate cu apă și săpun. După spălare se introduc într-o soluție fenicată 5% pentru dezinfecție. Din această soluție se scot pe o hârtie de filtru sterilă, îndepărtându-se picăturile de dezinfectant. Capetele oului se trec prin flacăra, apoi cu o baghetă de sticlă sterilă se deschid cei doi poli ai oului, lăsând să curgă conținutul într-un cilindru gradat steril. Se adaugă apoi apa sterilă sau serul fiziologic steril. Se omogenizează conținutul cu o baghetă de sticlă sterilă. Se filtrează prin hârtie de filtru și se repartizează în tuburi sterile. Sterilizarea se face prin tindalizare, la baia de nisip. Acest mediu se întrebuintează pentru creșterea bacilului tuberculos sau pentru păstrarea tulpinilor bacteriene în laborator, în special a bacteriilor intestinale.

Mediul Endo. Este un mediu de diagnostic diferențial între germenii din genurile *Escherichia* și *Salmonella*. În 1000 ml apă distilată

se dizolvă la cald 10 g peptonă, 5 g extract de carne și 20 g agar-agar. Se ajustează pH la 7,6 cu NaOH 10%. Se autoclavează la 115°C timp de 15 minute. Se filtrează prin hârtie de filtru. Se repartizează câte 100 ml în baloane. Se sterilizează din nou prin autoclavare la 120°C, 30 de minute. În paralel se prepară și următoarele soluții: a) soluția sterilă de lactoză 20% (sterilizarea s-a efectuat prin autoclavare la 110°C, 20 de minute); b) soluție sterilă de sulfat de Na 10% (sterilizarea s-a efectuat prin autoclavare la 115°C, 20 de minute); și c) soluție saturată alcoolică de fucsină bazică. În momentul întrebuirii, la 100 ml mediu lichid și răcit la 55°C se adaugă, în condiții de sterilitate 5 ml din soluția de lactoză 20%. Într-o eprubetă aparte se pipetează 1 ml din soluția alcoolică de fucsină bazică peste care se adaugă picătură cu picătură din soluția de sulfat de Na, agitând continuu, până când se obține decolorarea sau până apare o nuanță ușoară de roz. Acest amestec decolorat de fucsină-sulfat se adaugă și el peste geloza nutritivă și după agitare se toarnă în plăci Petri sterile. Mediul trebuie să fie ușor roz sau gălbui. În urma dezvoltării coloniilor de *E.coli*, culoarea mediului virează în roșu, iar în cazul coloniilor de *Salmonella* mediul își menține culoarea inițială.

Mediul Müller-Kauffmann. Servește pentru izolarea salmonelelor din fecale. Are următoarea compoziție:

Bulion cu pH 7,4	90 ml
CaCO ₃	5 g
Bilă de bou filtrată	5 ml

Amestecul se sterilizează 30 de minute la 120°C. După răcire se adaugă, în condiții de sterilitate, următoarele soluții:

- Soluție apoasă de verde brilliant 0,1%	1 ml
- Soluție Lugol	2 ml
- Soluție de Na ₂ S ₂ O ₃ 50%	10 ml

Soluția de verde brilliant 0,1% se sterilizează prin tindalizare, 30 de minute la 100°C, 3 zile consecutiv.

Soluția Lugol folosită în acest caz are următoarea compoziție:

J ₂	20 g
KJ	25 g
Apă distilată sterilă	100 ml

Această soluție nu trebuie încălzită (sterilizată).

Soluția de tiosulfat de Na se sterilizează la 120°C, 15 minute.

După adăugarea ultimelor 3 soluții amestecul se agită și se repartizează în tuburi sterile (10 ml/tub). Înainte de întrebuire se ține 48 ore la 37°C, pentru controlul sterilității.

Mediul Levine (EMB) (Eosine-Methylene Blue= engl. Eozină-albastru de metilen).

Se folosește pentru analiza microbiologică a apei. Se compune din:

Peptonă	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Agar-agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se filtrează prin hârtie de filtru sau vată. După răcire mediul se aduce la volumul inițial cu apă distilată. Nu este necesară ajustarea pH. Se repartizează în baloane câte 100 ml sau 200 ml. Se sterilizează la 121°C, 30 de minute. În momentul întrebuințării se lichefiază mediul pe baia de apă și apoi la 100 ml mediu se adaugă 5 ml soluție sterilă de lactoză 20% (sterilizarea s-a efectuat la 110°C, 20 de minute), 2 ml soluție apoasă de eozină galbenă 2% și 1,3 ml soluție apoasă de albastru de metilen 0,5%. Se omogenizează bine conținutul baloanelor și se toarnă în cutii Petri.

Mediu pentru izolarea genului *Aeromonas*

Peptonă din cazeină	10 g
Extract de carne	3 g
NaCl	5 g
Dextrină	15 g
Sulfid de Na	1,6 g
Na ₂ HPO ₄	7,75 g
Fucsina*	0,25 g
Agar	13 g
Apă distilată	1000 ml

pH=7,5.

*Se recomandă dizolvarea fucsinei în 50 ml soluție apoasă 5% de dioxan.

Ingredientele se dizolvă la cald. Se ajustează pH la 7,5 cu NaOH 10%. Se încălzește mediul până la fierbere. Se răcește și se filtrează. Se adaugă apoi fucsina și agarul. Se încălzește din nou mediul până la fierbere pentru lichefierea agarului. Dacă mediul are culoarea roșie se adaugă pentru decolorare câteva picături din soluția de sulfid de Na 1%. În final mediul se autoclavează la 121°C, 20 de minute.

Tulpinile de *Aeromonas*, spre deosebire de enterobacterii, degradează dextrina determinând colorarea mediului în roșu (fucsina se recolorează datorită apariției de aldehide). Vibrionii pot, de asemenea,

să ducă la înroșirea mediului, ei putând fi însă eliminați sub acțiunea selectivă a agentului vibriostatic 0 129 10 $\mu\text{g/ml}$ mediu.

Mediul Chapman. Este un mediu de diagnostic. Se întrebuințează pentru diferențierea stafilococilor patogeni de cei saprofiți. Are următoarea compoziție:

Extract de carne	8 g
Peptonă	9 g
NaCl	75-100 g
Manitol	10-100 g
Roșu de fenol	0,025-0,25 g
Apă distilată	1000 l

pH mediului se ajustează la 7,6. Sterilizarea se face la 110°C , 30 de minute. Mediul are culoarea roșie. Stafilococii patogeni care fermentează manitolul virează culoarea mediului în galben, iar cei saprofiți nu modifică culoarea mediului.

Mediul Löwenstein. Se folosește în vederea izolării bacilului tuberculos. Se prepară din:

Asparagină	3 g
KH_2PO_4	1 g
Citrat de Na	1 g
MgSO_4	1 g
Glicerol neutru	60 g
Apă distilată	1000 ml.

Amestecul se sterilizează în doi timpi, la început cu capacul deșurubat timp de 2 ore, apoi la 100°C , timp de 15 minute. Acest amestec se păstrează la rece timp îndelungat și reprezintă soluția mamă.

Pentru pregătirea mediului propriu-zis se amestecă într-un balon cu perle de sticlă 150 ml soluție mamă cu 12 g glicerol neutru și 6 g făină de cartofi. Se omogenizează bine. Amestecul se încălzește apoi la 100°C , timp de 15 minute, după care se continuă încălzirea la 56°C , timp de 60 de minute. În continuare la amestecul încălzit la 56°C se adaugă 4 ouă întregi și un gălbenuș de ou. Se agită bine amestecul. În final se adaugă 5 ml dintr-o soluție apoasă de verde de malachit 2%. Se filtrează apoi mediul prin tifon steril. Se repartizează în tuburi (6-7 ml/tub). Coagularea mediului se face în baia de nisip la 80°C , timp de 30 de minute. Sterilizarea se face prin tindalizare la $80-85^{\circ}\text{C}$, timp de 30 de minute, în două zile consecutiv.

Mediul Sauton. Se folosește pentru întrebuințarea în condiții de laborator a tulpinii BCG de *Mycobacterium bovis*. Se compune din:

Asparagină	4 g
Acid citric	2 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Apă distilată	20 ml

Ingredientele se fierb până la dizolvare completă. După răcire se adaugă 0,5 g citrat de fier amoniacal. Se agită până la completa lui dizolvare. Se adaugă în continuare 800 ml apă distilată în care s-au dizolvat 60 g glicerol neutru. Se ajustează pH la 7,2 cu amoniac. Se repartizează în tuburi sau balonașe și se sterilizează 30 de minute la 120°C.

Mediul Drigalski. Este un mediu de diagnostic diferențial între genurile *Escherichia* și *Salmonella*. Are următoarea compoziție:

Zeamă de carne	1000 ml
Peptonă	10 g
NaCl	5 g
Lactoză	15 g
Turnesol soluție 10%	60 ml
Agar-agar	20 g

Ingredientele se dizolvă la cald. Se ajustează pH la 7,4. Se autoclavează la 110°C, 20 de minute. Se filtrează prin hârtie de filtru. Se repartizează în eprubete (7 ml/eprubetă). Se sterilizează din nou la 110°C, 20 de minute. Mediul are culoarea violet deschis. Coloniile de *Samonella* produc virarea culorii în albastru, iar cele de *E. coli* în roșu.

Mediul Istrati-Meitert. Pe acest mediu de diagnostic se diferențiază *E. coli* de *Salmonella* și *Proteus*. Are următoarea compoziție:

Geloză nutritivă	100 ml
Lactoză	1,5 g
Bilă de bou uscată la 105°C	0,8 g
Citra de Na	0,8 g
Na ₂ S ₂ O ₃	0,85 g
Citrat de Fe	0,2 g
Soluție de albastru de bromtimol	4 ml

La geloză nutritivă lichefiată se adaugă restul ingredientelor și se încălzește la 80°C până la completa lor dizolvare. Se ajustează pH la 7,3-7,4. Se sterilizează la 110°C, 20 de minute. Pe acest mediu care neînsământat este de culoare verde, coloniile de *Salmonella* apar albastru verzui, cele de *E. coli* galbene și cele de *Proteus* albastru-verzui, cu centrul mai opac, neinvadante.

Mediul Thornton. Se aplică pentru cultivarea bacteriilor din sol și din apă. Are următoarea compoziție:

K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$CaCl_2$	0,1 g
$NaCl$	0,1 g
$FeCl_3$	0,002 f
KNO_3	0,5 g
Asparagină	0,5 g
Glucoză	20 g
Agar-agar	20 g
Apă distilată	1000 ml

Ingredientele se dizolvă la cald. pH-ul se ajustează la 7,6. Sterilizarea se face la 105°C, 20 de minute, 3 zile consecutive.

Mediul cu glucoză-peptonă-agar. Este un mediu simplu întrebuințat pentru detectarea germenilor termofili (*Bacillus stearothermophilus*) și pentru clostridii.

Triptonă sau peptonă	10 g
Glucoză	5 g
Purpură de bromcrezol soluție 0,04%	10 ml
Agar-agar	10 g
Apă distilată	1000 ml

Ingredientele se dizolvă la cald. Se ajustează pH la 6,8-7. Se sterilizează prin tindalizare la 100°C, 30 de minute, în 3 zile consecutive. Colorantul purpură de bromcrezol este încorporat de către coloniile plate, acestea având astfel un halou galben.

Mediul Crossley, cu lapte. Se folosește pentru cultivarea și uneori pentru identificarea bacteriilor anaerobe responsabile de alterarea alimentelor conservate. Are următoarea compoziție:

Lapte smântănit	1000 ml
Peptonă	10 g
Purpură de bromcrezol soluție 0,04%	15 ml

Se sterilizează prin tindalizare la 100°C, 30 de minute, în 3 zile consecutive.

Mediul selenit-cistină. Este un mediu selectiv care servește la izolarea salmonelilor. Este alcătuit din două soluții I și II.

Soluția I conține:

Selenit acid de sodiu ($NaHSeO_3$)	4 g
Apă distilată până la	200 ml

Soluția II se compune din:

Triptonă	4 g
Manitol	4 g
Na_2HPO_4	5,5 g
KH_2PO_4	4,5 g

L-Cistină soluție 1%

1 ml

Apă distilată până la

800 ml

Soluțiile sunt sterilizate separat, timp de 30 de minute la 100°C, în autoclavul deschis, în 3 zile consecutive. Se păstrează la frigider. În momentul folosirii se amestecă soluția I cu soluția II, se controlează pH, care trebuie să fie la valoarea 7. Se repartizează în tuburi sau baloane sterile. Se sterilizează din nou la 100°C, 20 de minute. Menționăm că soluția L-Cistină se prepară dizolvând 1 g substanță în 10-20 ml soluție de NaOH 0,1 N și completând cu apă sterilă la 100 ml. Se sterilizează 20 de minute prin fierbere și se păstrează la temperatura camerei în flacoane brune, la adăpost de lumină.

Mediul selenit acid de sodiu. Este tot un mediu selectiv recomandat pentru izolarea salmonelelor. Se compune din două soluții: I și II.

Soluția I:

NaHSeO₄

4 g

Apă distilată până la

200 ml

Soluția II:

Lactoză

4 g

Peptonă

5 g

Na₂HPO₄

5 g

KH₂PO₄

5 g

Apă distilată până la

800 ml

Ambele soluții se sterilizează separat la 100°C, în autoclavul deschis, timp de 30 de minute. Soluția I are un aspect limpede, fiind incoloră. Soluția II prezintă un ușor precipitat, pentru care se lasă 24 de ore la temperatura camerei și apoi se decantează peste soluția I. Se verifică pH, care trebuie să fie egal cu 7. Se repartizează, în condiții de sterilitate, în eprubete sterile (8-10 ml mediu/eprubetă).

Mediul Wilson-Blair. Este un mediu selectiv utilizat pentru izolarea salmonelelor și a bacteriilor din genul *Proteus*. Se prepară din 4 componente (A,B,C și D).

A. Este un amestec de bază alcătuit din 4 soluții:

a). Se dizolvă 3 g citrat de bismut amoniacal în 25 ml apă sterilă, răcită. După dizolvarea substanței se adaugă picătură cu picătură, agitând mereu, 1 ml de NaOH 10%. Dacă dizolvarea nu se produce, sarea pierzând o parte din amoniac, se adaugă 1 sau 2 picături dintr-o soluție de amoniac (d=0,91). Dacă nu se dizolvă nici după adăugarea amoniacului, substanța nu poate fi utilizată.

b). Se dizolvă 10 g sulfat de sodiu anhidru în 35 ml apă sterilizată răcită, iar dacă substanța este cristalizată (Na₂SO₄•7H₂O), cantitatea utilizată va fi dublată (20 g). Sulfatul de sodiu putându-se degrada cu

ușurință se va verifica conținutul în substanță activă, care trebuie să fie de minimum 60%.

c). Se dizolvă 12,6 g fosfat acid de sodiu cristalizat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) în 15 ml apă sterilă încălzită la 50-60°C.

d). Se dizolvă 10 g glucoză în 25 ml apă sterilă răcită. Soluția se încălzește apoi până la fierbere, menținându-se la această temperatură timp de 1 minut.

Se amestecă apoi soluțiile în ordinea a+b+c+d, obținându-se amestecul de bază, care se agită și se păstrează la întuneric, la temperatura camerei. Amestecul de bază se utilizează atâta timp cât își păstrează aspectul alb-lăptos.

B. Sulfat feros, soluție 8% în apă sterilă (se dizolvă la rece). Cu timpul soluția capătă un depozit. Nu se agită, ci se folosește lichidul clar, supernatant.

C. Verde brilliant, soluție 0,5% în apă sterilă (se dizolvă la rece). Această soluție se utilizează maximum 2 luni de la preparare.

D. Geloză nutritivă 2%.

Mediul trebuie preparat în momentul întrebuintării. În acest scop geloză nutritivă se lichefiază și se răcește la 50°C. Se adaugă apoi la 100 ml geloză nutritivă 1 ml sulfat feros, soluție 8%, 1 ml de verde brilliant 0,5% și 20 ml amestec de bază, agitat înainte de folosire. Se agită și se toarnă în cutii Petri. Bacteriile din genul *Salmonella* cresc fie sub formă de colonii negre cu diametrul de 1-2 mm, turtite, aderente la mediu, cu luciu și halou metalic, fie sub formă de colonii mici de culoare verde-albăstruie. Bacteriile din genul *Proteus* cresc sub formă de colonii maronii-negre, lipsite de luciu.

Mediul Leifson modificat de Hynes.

(Mediul geloză-dezoxicolat-citrat)

Se utilizează pentru diferențierea bacteriilor din genul *Salmonella* de cele din genul *Proteus* și de bacteriile coliforme.

Se compune dintr-o geloză nutritivă de bază:

Agar-agar	2,5 g
Extract de carne	5 g
Peptonă	5 g
Lactoză	10 g
Apă până la	1000 ml

Ingredientele se dizolvă prin fierbere. Se ajustează pH până la 7,4. Se adaugă apoi 1,3 ml soluție de roșu neutru 2%. Se repartizează câte 100 ml în baloane și se sterilizează la 115°C, timp de 20 minute. Se păstrează la frigider.

Mediul mai conține două soluții: A și B.

Soluția A se prepară din:

Citrat de sodiu ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	17 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	17 g
Citrat de fier	2 g
Apă distilată sterilizată până la	100 ml
Se sterilizează la 60°C, timp de 60 minute. Se păstrează la temperatura camerei.	

Soluția B este formată din:

Dezoxicolat de Na	10 g
Apă distilată sterilă până la	100 ml
Se sterilizează la 60°C, timp de 60 minute. Se păstrează la temperatura camerei.	

În momentul folosirii se topește geloză nutritivă de bază și după răcire la 50°C se adaugă, în condiții de sterilitate, 5 ml soluție A și 2,5 ml soluție B. Se omogenizează și se toarnă în cutii Petrișterile.

Bacteriile din genul *Salmonella* cresc sub formă de colonii plate, având aproximativ 2-4 mm diametru, marginea incoloră sau albicioasă și centrul cenușiu, castaniu sau negru sau sub formă de colonii mici, incolore sau albicioase.

Bacteriile din genul *Proteus* cresc sub formă de colonii mari, incolore, cu centrul negru sau portocaliu sau sunt de mărime mijlocie, de culoare roz-deschis. Bacteriile coliforme formează colonii roșii, de mărime mijlocie.

Mediul Gassner. Este un mediu selectiv pentru diferențierea bacteriilor din genul *Salmonella* de cele coliforme. Are următoarea compoziție:

Geloză nutritivă (cu agar 3%), pH=7,6	1000 ml
Soluție metachromgelb 2%	62,5 ml
Soluție Wasserblau 1%	87,5 ml
Lactoză	50 g

În momentul utilizării, la 1000 ml geloză nutritivă lichefiată și răcită la 50°C se adaugă soluția apoasă de metachromgelb, care s-a preparat în apă distilată sterilizată, răcită și apoi s-a fiert 2 minute. Apoi se adaugă soluția apoasă de Wasserblau în care s-a dizolvat lactoza prin fierbere timp de 20 minute. Amestecul se agită bine, se distribuie în baloane și se sterilizează la 110°C, timp de 20 de minute.

Bacteriile din genul *Salmonella* cresc sub formă de colonii galbene, coloniile de bacterii coliforme sunt de culoare albastră-verzuie cu nuanțe până la albastru închis.

Mediul ETGPA (Mediul Baird-Parker)

[Egg (engl.)= ou; telurite (engl.)=telurit; glycine (engl.)=glicină; pyruvate (engl.)=piruvat; agar (engl.)=agar-agar].

Se utilizează pentru evidențierea stafilococilor coagulazo-pozitivi.

Compoziție:

Triptonă	10 g
Extract de carne	5 g
Extract de drojdie	1 g
LiCl	5 g
Agar-agar	15-20 g
Apă distilată până la	1000 ml

Preparare.

Se dizolvă constituenții în apă distilată la fierbere și se potrivește pH la 6,8. Fără să se filtreze, se repartizează câte 90 ml în baloane de 200 ml și se sterilizează la 120°C, 20 de minute. După autoclavare pH trebuie să fie 6,8-7,0. Înainte de folosire se adaugă în 90 ml mediu lichefiat și răcit la 45-50°C, următoarele soluții sterilizate prin filtru Seitz și încălzite la aceeași temperatură (45-50°C):

- | | |
|---------------------------------------|------|
| a). Glicină, soluție apoasă 20% | 6 ml |
| b). Telurit de K, soluție apoasă 1% | 1 ml |
| c). Piruvat de Na, soluție apoasă 20% | 5 ml |
| d). Emulsie de gălbenuș de ou | 5 ml |

Se amestecă bine și se toarnă imediat, câte 10-15 ml în cutii Petri. Mediul astfel pregătit trebuie folosit numai în primele 24 ore. Teluritul de K folosit trebuie în prealabil controlat cu tulpini de stafilococi coagulopozitivi, pentru a vedea dacă coloniile capătă aspectul caracteristic (culoare neagră lucitoare) și astfel dacă substanța se poate utiliza.

Pentru emulsia de gălbenuș de ou se pregătesc ouă proaspete de găină ca și în cazul mediului cu ou Dorset. Apoi gălbenușurile se recoltează în eprubete mari, sterile. Se emulsionează un gălbenuș de ou în 250 ml soluție de NaCl 0,85% sterilă (sterilizarea se face la 120°C, 30 de minute), după care se tindalizează timp de 30 de minute într-o baie de apă la 55°C. Operația de tindalizare se repetă în 3 zile consecutiv. Emulsia de gălbenuș de ou se păstrează la frigider.

După turnarea mediului în cutiile Petri și solidificarea acestuia, înainte de însămânțare, cutiile Petri se vor introduce în termostat la 37°C, timp de 3-4 ore, pentru a se svânta suprafața mediului.

Coloniile de stafilococi coagulazo-pozitivi prezintă următoarele caracteristici: sunt rotunde, convexe, având un diametru de 1-1,5 mm, de culoare neagră lucitoare cu o margine albă; ele sunt înconjurate de o zonă de clarificare de 2-5 mm.

Mediul GTP

(geloză-lactoză-manitol-clorură de sodiu cu adaos de gălbenuș de ou și telurit de potasiu)

Se utilizează tot pentru detectarea stafilococilor coagulazopozitivi.

Compoziție:

Triptonă sau peptonă	10 g
Extract de drojdie	2,5 g
Lactoză	2 g
Manitol	10 g
NaCl	75 g
Fosfat bipotasic	5 g
Agar-agar	10-20 g
Apă distilată până la	1000 ml.

Preparare:

Se încălzește apa pentru a se dizolva toate ingredientele. Se ajustează pH la 7. Se repartizează în baloane câte 100 ml. Se sterilizează la 120°C, timp de 30 de minute.

În momentul întrebuițării, mediul se lichefiază pe baia de apă, se răcește la 45-50°C, după care se adaugă:

- emulsie de gălbenuș de ou (pregătită ca și la mediul ETGPA, cu deosebirea că gălbenușul de ou se emulsionează în părți egale cu soluția de NaCl 0,85%) 1 ml
- Sulfat feros soluție sterilă 0,1% (sterilizarea se face prin filtrare, folosind filtrul Seitz) 1 ml
- Telurit de potasiu, soluție apoasă sterilă 1% (sterilizată prin același procedeu ca și cea de sulfat feros) 1 ml.

Înainte de însămânțare și acest mediu trebuie lăsat în termostat la 37°C, timp de 2 ore, pentru a se svânta.

Stafilococii coagulazopozitivi cresc pe acest mediu sub formă de colonii rotunde, convexe, negre lucitoare sau mate, având diametrul de 1-2 mm și fiind înconjurată de o zonă opacă albă-gălbuie, cu un precipitat granular, al cărui diametru depășește 1 mm. Această zonă opacă este vizibilă uneori după 24 ore de incubare la 37°C, dar cel mai adesea după 36-48 ore. Diametrul zonei opace se mărește, dacă mediul se păstrează câteva zile la temperatura camerei. Uneori zona opacă cu precipitatul se află situată sub colonie și poate fi mai bine vizibilă dacă se îndepărtează colonia cu o ansă.

Mediul Geloză - cu sulfat de Na, polimixină B și neomicină
Se utilizează pentru detectarea clostridiilor sulfitoreducătoare.

Compoziție:

A. Mediul de bază:

Triptonă	15 g
Extract de drojdie	10 g
Extract de carne	3 g
Agar-agar	15 g

Apă distilată până la 1000 ml

Mediul trebuie să aibă pH 7. Se distribuie câte 100 ml în baloane de 250 ml. Se sterilizează la 120°C, timp de 20 minute.

B. Soluția sterilă de sulfat de Na. Se prepară o soluție proaspătă 5% de sulfat de sodiu anhidru (conținând 22-24 % SO₂) în apă distilată sterilizată și apoi se fierbe timp de 3 minute.

C. Soluție sterilă de sulfat feros. Se prepară o soluție 2% de sulfat feros care se sterilizează apoi 20 de minute la 120°C.

D. Soluție sterilă de sulfat de polimixină B. Se prepară în mod steril o soluție de sulfat de polimixină B 0,1%, în apă distilată sterilizată. Soluția se filtrează prin filtrul Seitz.

E. Soluție sterilă de sulfat de neomicină. Se prepară în mod steril o soluție 0,5% de sulfat de neomicină. Soluția se filtrează prin filtrul Seitz.

Preparare.

Se lichefiază mediul de bază pe baia de apă și se răcește la aproximativ 55°C. La 100 ml mediu de bază (A) se adaugă:

- Soluție de sulfat de sodiu 5% (B) 1 ml
- Soluție de sulfat feros 2% (C) 1 ml
- Soluție de sulfat de neomicină B 0,1% (D) 2 ml
- Soluție de sulfat de neomicină 0,5% (E) 1 ml

Clostridiile sulfitoreducătoare cresc sub forma unor colonii de culoare neagră.

Mediul DRCA

Se întrebuințează pentru izolarea și numărarea clostridiilor sulfitoreducătoare.

Compoziție

Peptonă	10 g
Extract de carne	10 g
Extract de drojdie	1,5 g
Acetat de Na	5 g
Amidon solubil	1 g

Glucoză	1 g
Cisteină	0,5 g
Agar-agar	15 g
Apă distilată până la	1000 ml.

Preparare

Se dizolvă la fierbere peptona, extractul de carne, extractul de drojdie, acetatul de sodiu și agar-agarul în 800 ml apă.

Se adaugă amidonul în puțină apă rece, se agită bine și apoi se completează la 200 ml cu apă, se fierbe, agitându-se până se obține o pastă. Se adaugă această pastă de amidon la cei 800 ml amestec de mai sus și se fierbe timp de 30 de minute pentru a se dizolva toate ingredientele. Apoi se adaugă glucoza și cisteina. pH trebuie ajustat la 7,1. Se sterilizează timp de 20 de minute la 105°C, în 3 zile consecutive. Clostridiile sulfitoreducătoare cresc sub forma unor colonii având culoarea neagră.

3.4. Medii pentru cultivarea ciupercilor (micromicetelor)

Mediul Sabouraud. Are compoziția următoare:

Peptonă	10 g
Maltoză sau glucoză	40 g
Agar-agar	20 g
Apă distilată	1000 ml

Se amestecă ingredientele și se dizolvă prin fierbere. Se ajustează pH la 5-5,6. Se sterilizează prin autoclavare la 115°C, timp de 20 de minute. Se utilizează mai mult pentru cultivarea ciupercilor dermatofite.

Mediul Czapek-Dox. Se compune din:

Zaharoză	30 g
K_2HPO_4	1 g
$NaNO_3$	3 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
KCl	0,5 g
$FeSO_4$	0,01 g
Agar-agar	20 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă toate sărurile în 500 ml apă distilată. Se adaugă apoi zaharoza. Agarul se dizolvă separat în 500 ml apă distilată. Se amestecă cele două soluții și se autoclavează la 115°C timp de 20

de minute. Acest mediu servește pentru cultivarea ciupercilor parazite și saprofite.

Mediul Martin. Servește pentru determinarea ciupercilor din sol. Este alcătuit din:

Glucoză	20 g
Peptonă	10 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
Roz bengal	0,033 g
Agar-agar	20 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele la cald. Se repartizează în eprubete sau baloane. Se sterilizează la 110°C timp de 20 de minute. În momentul întrebuițării la mediul lichefiat și răcit la 45-50°C se adaugă cu o pipetă gradată sterilizată 0,5 ml dintr-o soluție de sulfat de streptomicină 0,15 %. (Soluția de streptomicină se prepară în apă sterilizată). Roz bengalul și streptomicina se adaugă cu scopul de a inhiba dezvoltarea bacteriilor.

3.5. Medii pentru unele grupe fiziologice de microorganisme

3.5.1. Mediu pentru cultivarea bacteriilor heterotrofe aerobe (Laurent, 1964)

Peptonă	5 g
Extract de drojdie	1 g
Fosfat feric (Fe)PO ₄	0,1 g
Agar-agar	12 g
H ₂ O dist.	1000 ml
pH - 7,5 - 7,6	

Sterilizarea se efectuează la 120°C timp de 30 de minute.

3.5.2. Mediu pentru cultivarea bacteriilor heterotrofe anaerobe (Laurent, 1964)

Peptonă	5 g
Extract de drojdie	1 g
Glucoză	10 g
Tioglicolat de Na	1 g
Fosfat feric	0,1 g
Albastru de metilen	0,02 g
Agar-agar	12 g
H ₂ O dist.	1000 ml
pH - 7,5 - 7,6	

Glukoza și tioglicolatul de Na se sterilizează separat prin filtrare sau prin tindalizare la 100°C. Restul mediului se sterilizează la

120°C, 30 de minute. Incubarea are loc în condiții anaerobe la 28°C, timp de 5-20 de zile.

3.5.3. *Mediu pentru bacteriile amonificatoare*
(Rodina, 1965)

Asparagină	0,5 g
Manitol	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ •6H ₂ O	0,1 g
KNO ₃	0,5 g
FeCl ₂ •6H ₂ O	0,002 g
NaCl	0,1g
Agar	15 g
Apă de robinet	1000 ml
pH - 7,2	

Sterilizarea: 105°C, 30 de minute în 3 zile consecutive. Incubare: 72 ore la 27°C.

3.5.4. *Mediu pentru microorganismele amilolitice*
(Pochon și Tardieux, 1962)

Amidon solubil	1,5 g
NH ₄ NO ₃	1,0 g
Extract de sol	10 ml
Soluție salină standard	50 ml
Soluție de oligoelemente	1 ml
pH - 7,0	

Mediul se repartizează în eprubete, 10 ml/eprubetă. Se sterilizează la 110°C, 20 de minute în 2 zile consecutive. Incubare: 15 zile la 27°C. După incubare se adaugă 1-2 picături de JJK/eprubetă.

Soluția salină standard

K ₂ HPO ₄	5 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	2,5 g
NaCl	2,5 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,5 g
MnSO ₄	0,05 g
Apă de robinet	1000 ml

Soluția de oligoelemente

FeCl ₃ •6H ₂ O	1,5 g
H ₃ BO ₃	0,1 g
ZnSO ₄	0,01 g

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$	0,005 g
CuSO_4	0,005 g
MnCl_2	0,005 g
H_2O distilată	1000 ml

3.5.5. *Mediu pentru microorganisme fixatoare de N_2 aerobe*
(Pochon și Tardieux, 1962)

Manitol	10 g
Extract de sol	10 ml
Soluție salină standard	50 ml
Soluție de oligoelemente	1 ml
CaCO_3	0,5 g
H_2O distilată	1000 ml
pH – 7,0	

Repartizare în eprubete (5 ml/eprubetă). Sterilizare la 120°C , 20 de minute. Însămânțare: 1 ml. Incubare la 27°C , 7-15 zile.

3.5.6. *Mediu pentru microorganisme fixatoare de N_2 anaerobe*
(Pochon și Tardieux, 1962)

Glucoză	10 g
K_2HPO_4	5 g
NaOH n/10	33 ml
Soluție salină standard	50 ml
Soluție de oligoelemente	1 ml
Extract de sol	10 ml
H_2O distilată	1000 ml
pH – 7,0	

Se repartizează în eprubete (10 ml/eprubetă). Se sterilizează la 120°C , 20 de minute. Incubarea în anaerobioză, la 27°C , 7-15 zile.

3.5.7. *Mediu pentru germenii denitrificatori*
(Rodina, 1965)

Soluția I.

Asparagină	1 g
Glucoză	20 g
KNO_3	4 g
H_2O distilată	1000 ml

Soluția II

Citrat de Na	0,5 g
K_2HPO_4	4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4 g
CaCl_2	0,4 g
FeCl_2	urme

Ambele soluții se sterilizează la 110°C, 20 de minute. Se amestecă, în momentul folosirii, în proporții egale. pH final= 7,0. Se adaugă apoi 10 ml soluție de albastru de bromtimol. Mediul final se repartizează în tuburi sterile, în coloană înaltă, în condiții de sterilitate. Incubare: 14-15 zile la 27°C.

3.5.8. Mediu pentru microorganismele celulolitice aerobe

(Pochon și Tardieux, 1962)

Soluție salină standard	50 ml
NH ₄ NO ₃	1 g
Extract de sol	20 ml
Soluție de oligoelemente	1 ml
H ₂ O distilată	1000 ml
pH – 7,0	

Se repartizează în eprubete (6 ml/eprubetă+o bandă de hârtie de filtru calitativă cu dimensiuni de 9 x 1 cm). Sterilizare: la 110°C, 20 de minute.

3.5.9. Mediu pentru microorganismele celulolitice anaerobe

(Pochon și Tardieux, 1962)

Soluție salină standard	50 ml
NH ₄ NO ₃	2 g
Peptonă	1 g
Extract de sol	20 ml
CaCO ₃	3 g
Celuloză pulvis (5%)	20 ml
H ₂ O distilată	1000 ml
pH – 7,0	

Mediul se repartizează în eprubete (10 ml/eprubetă). Se introduce și un tubușor Durham. Se sterilizează la 110°C, 20 de minute, în 2 zile consecutive.

3.5.10. Mediu pentru cultivarea bacteriilor sulfatreducătoare

(Abd El-Malek și Rizk, 1963)

NH ₄ Cl	1 g
Peptonă	0,5 g
Extract de drojdii	0,5 g
Lactat de Na (60%)	4,5 ml
Na ₂ SO ₄	1 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	2 g
CaCl ₂	0,1 g
Soluție de oligoelemente	1 ml
pH – 7,0	

Se repartizează în eprubete (10 ml/eprubetă și apoi se adaugă un cui mic). Sterilizarea la 120°C, 20 de minute. Incubarea: 15-20 zile, la

27°C, în anaerobioză. În prezența H_2S , eliminat în procesul de reducere a sulfatilor se formează FeS , de culoare neagră.

3.6. Indicatori utilizați în microbiologie

Andrade. Se dizolvă 0,5 g fucsină acidă în 100 ml apă distilată. Se adaugă hidroxid de Na soluție 1 N până când culoarea se schimbă în galben. Este incolor la pH 7,2, roz în soluții acide și galben în soluții alcaline.

Purpură de bromcrezol. Se dizolvă 0,1 g purpură de bromcrezol în 9,2 ml soluție de hidroxid de Na 0,02 N și se diluează apoi cu apă distilată până la 250 ml. Are culoarea galbenă la pH 5,8 și albastră la pH 6,8. Se folosește în soluție de 0,04%.

Albastru de bromtimol. Se dizolvă 0,1 g albastru de bromtimol în 8 ml hidroxid de Na 0,02 N și se completează apoi cu apă distilată până la 250 ml. Are culoarea galbenă la pH 6 și albastră la pH 7,6. Se folosește în soluție de 0,04%.

Roșu de Congo. Se dizolvă 0,1 g roșu de Congo în 100 ml apă distilată. Are culoarea albastră la pH 3,0 și roșie la pH 5,2.

Roșu de metil. Se dizolvă 0,1 g roșu de metil în 300 ml etanol 96°, după care se adaugă 200 ml apă distilată. Are culoarea roșie la pH 4,4 și galbenă la pH 6,2.

Fenolftaleină. Se dizolvă 1 g fenolftaleină în 100 ml etanol 96°. Este incoloră la pH 8,3 și colorată în roșu la pH 10.

Roșu de fenol. Se dizolvă 0,1 g roșu de fenol în 14,1 ml soluție de hidroxid de Na 0,02 și se diluează la 250 ml cu apă distilată. Este galben la pH 6,8 și roșu la pH 8,4. Se întrebuințează sub formă de soluție 0,04 %.

Albastru de timol. Se dizolvă 0,1 g albastru de timol în 10,75 ml soluție de hidroxid de Na 0,02 N și se diluează cu apă distilată până la 250 ml. Are un registru acid: culoare roșie la pH 1,2 și galbenă la pH 2,8; un registru alcalin: culoare galbenă la pH 8 și albastră la pH 9,6.

4. TEHNICA ÎNSĂMÂNȚĂRII MICROORGANISMELOR

Prin însămânțare se înțelege trecerea pe medii de cultură a microorganismelor din produsele patologice sau din alte surse (apă, sol, lapte etc.), în vederea cultivării și izolării lor în culturi pure. Microorganismele se cultivă pe medii de cultură în scopuri diferite și anume: pentru examinarea caracterelor culturale, morfologice, biochimice și serologice în vederea identificării lor; pentru a le conserva; pentru a prepara vaccinuri sau pentru a le inocula la animale în vederea preparării serurilor imune sau a determinării patogenității. Culturile microbiene se mai obțin și prin transplantare, operație ce constă în trecerea microorganismelor din culturi vechi pe medii proaspete.

În timpul executării însămânțărilor trebuie să se țină seama de următoarele reguli:

- a) Însămânțările să se execute în fața unui bec de gaz, care asigură sterilitatea operațiunii;
- b) în timpul însămânțării este interzis să se vorbească și trebuie evitată orice mișcare în jurul executantului;
- c) Însămânțările să se execute cât mai repede, urmărind un contact minim al materialului de însămânțat cu aerul nesteril;
- d) trebuie evitată atingerea instrumentului cu care se execută însămânțarea de orice obiect nesteril (mâna executantului, halat, gura tubului, masa de lucru etc.);
- e) în timpul în care recipientele cu mediile sterile ori însămânțate sau cu culturile pure sunt deschise, se urmărește ținerea acestora într-o poziție oblică, cât mai aproape de orizontală, cu gura în imediata apropiere a flăcării.

Însămânțarea se poate executa cu pipeta Pasteur sau cu ansa de însămânțare. Se recomandă ca întotdeauna să se însămânțeze perechi de medii și anume un mediu lichid și unul solid.

4.1. Însămânțarea cu pipeta Pasteur

Eprubetele cu mediile ce urmează a fi însămânțate se așează într-un stativ la îndemâna mâinii stângi a executantului. Materialul de însămânțat se așează în fața executantului, lângă becul de gaz, iar la îndemâna mâinii drepte trebuie să se găsească un stativ cu anse, cu pipete Pasteur, cu spatule de flambare și un vas cu soluție

dezinfectantă pentru pipete. Se ia în mâna dreaptă pipeta Pasteur, se flambează extremitatea prin care se aspiră, apoi i se rupe vârful și se trece de câteva ori prin flacăra. În mâna stângă se ia eprubeta cu materialul ce urmează a fi însămânțat. Cu degetul mic al mâinii drepte se scoate dopul, se flambează gura eprubetei și se introduce prin flacăra vârful pipetei în eprubetă. Se aspiră o cantitate mică din materialul de însămânțat. Se scoate pipeta din lichid, se flambează gura eprubetei și se închide cu dopul de vată. Se pune eprubeta cu materialul de însămânțat în stativ și apoi se ia eprubeta cu mediul lichid ce urmează a fi însămânțat. Se scoate dopul, se flambează gura eprubetei, se introduce pipeta cu materialul de însămânțat, se lasă să curgă, oprind câteva picături. Se scoate pipeta din eprubeta cu mediu lichid, se flambează gura eprubetei și se închide. Se pune eprubeta cu mediul lichid însămânțat înapoi în stativ și se ia eprubeta cu mediu solid. Aceasta se deschide cu aceleași măsuri de precauție la flacăra, se introduce pipeta oprindu-se vârful în dreptul extremității superioare a agarului înclinat și se însămânțează lăsând materialul să se prelingă pe suprafața mediului de sus în jos, după care se scoate pipeta din eprubetă și aceasta se închide după flambare. Pipeta cu care s-a executat însămânțarea se introduce în vasul cu dezinfectant.

4.2. Însămânțarea cu ansa

Se sterilizează firul (acul) ansei de însămânțare prin încălzire la roșu, iar tija prin flambare, de 3 ori succesiv. Se așteaptă câteva secunde. Se deschide tubul cu materialul de însămânțat. Se ia cu ansa o cantitate mică de cultură microbiană prin raciare (fig.12). Se închide apoi eprubeta, flambând mai întâi gura la flacăra. Se introduce apoi ansa cu materialul de însămânțat în eprubetă cu mediul lichid. Se face însămânțarea prin clătirea acului în mediu. Apoi fără a mai flamba ansa, aceasta se introduce în eprubeta cu mediul solid. Însămânțarea se poate face în două feluri: 1. se plimbă vârful acului în zig-zag pe suprafața mediului, pornind din lichidul de condensare spre partea superioară a mediului și 2. se clătește vârful acului în lichidul de condensare și apoi se întinde pe întreaga suprafață a mediului prin înclinarea eprubetei. La închiderea și deschiderea eprubetelor se iau aceleași măsuri de asigurare a sterilității, flambând gura lor imediat după deschidere și înainte de închidere. Inelul (vârful) ansei încă umed se introduce în partea

interioară (rece, reducătoare) a flăcării becului de gaz până când se usucă. Apoi se ține în partea exterioară (caldă, oxidantă) a flăcării până la înroșirea întregului fir. Tija ansei se trece apoi de mai multe ori prin flăcăre. Ansa sterilizată se așează în stativ.

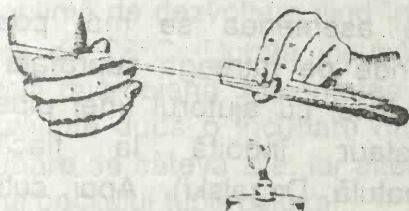


Fig. 12. Însământarea gelozei nutritive cu ansa

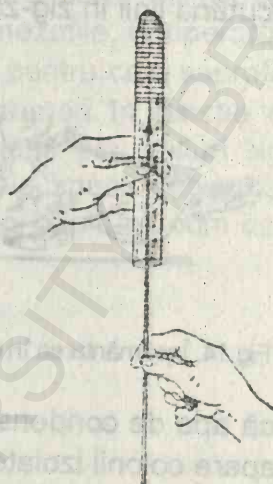


Fig. 13. Însământarea prin întepare

4.3. Însământarea prin întepare

Se face cu acul drept, care după ce a fost încărcat cu materialul de însământat se introduce în profunzimea mediului (agar solidificat vertical), pe linia mediană. În timpul însământării, eprubeta se ține cu deschiderea în jos, însământarea făcându-se de jos în sus (fig. 13).

4.4. Însământarea în cutii Petri

Se execută pe suprafața mediilor solide turnate în cutii Petri. Mediul solid (geloza simplă) se lichefiază pe baia de apă și apoi se răcește la 45-50°C. Se toarnă apoi, în condiții de sterilitate, în cutiile Petri sterile, în așa fel ca să se obțină un strat de 4-5 mm grosime. Însământarea se face: 1. înainte de solidificarea mediului și 2. după solidificarea mediului. Înainte de solidificarea mediului însământarea se face cu pipeta Pasteur sau pipeta gradată sterilizată. Se pipetează o anumită cantitate din materialul de însământat (de obicei oțuit în apă de robinet sterilizată sau în ser fiziologic steril), după care se omogenizează bine cu mediul (prin rotirea cu atenție a cutiei

Petri). După solidificarea mediului, din materialul de însămânțat se pune o picătură cu ajutorul unei pipete Pasteur sterile pe suprafața mediului. Materialul de însămânțat se împrăștie cu ajutorul ansei, fie executând linii în zig-zag, fie linii perpendiculare una pe alta (fig. 14).

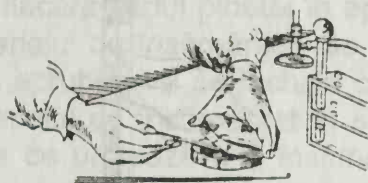


Fig.14. Însămânțarea în cutii Petri

De asemenea se mai poate întinde pe întreaga suprafață a mediului cu ajutorul unei pipete Pasteur îndoită la flacără (spatulă Drigalski). Apoi cutiile Petri se pun la incubat cu capacul în jos pentru ca apa de condensare să cadă în capac.

Dacă apa de condensare s-ar forma pe suprafața agarului, atunci nu ar apare colonii izolate (coloniile s-ar spăla și ar conflua).

4.5. Însămânțarea din materialele patologice

Nu se deosebește de cea descrisă mai înainte. Diferă doar tehnica de recoltare a materialului cu care se face însămânțarea.

a). *Însămânțarea din organe.* Suprafața organului se cauterizează în prealabil cu o spatulă de flambare. Însămânțarea se face cu o pipetă Pasteur sterilă care se introduce în organ și se aspiră mișcând ușor pipeta în interiorul organului.

b). *Însămânțarea din materiale patologice lichide* (sânge, exudate, secreții, excreții). Se face cu pipeta Pasteur. Recoltarea sângelui se face prin puncții cu seringi și ace sterile. La animale de laborator (iepuri, cobai) prin puncția cordului, la animale mari prin puncții venoase. Recoltarea exudatelor (lichid pleural, peritoneal, puroi etc.) se face prin puncția sterilă a cavităților respective, cu acul și unde este posibil cu pipeta Pasteur. Secrețiile și excrețiile se recoltează în mod diferit în funcție de produs (laptele cu sondă mamară, urina direct din vezică cu un cateter steril).

c). *Însămânțarea de pe suprafața mucoaselor.* Se execută cu ajutorul unor tampoane sterile, cu care se tamponează mucoasa respectivă, după care se face însămânțarea direct cu tamponul pe medii sau tamponul se spală într-un lichid diluant steril și apoi se face însămânțarea.

După efectuarea însămânțărilor pe eprubetele sau recipientele cu mediu însămânțat se notează simbolul tulpinii și data însămânțării. Mediile însămânțate se pun la incubat în termostat. Temperatura de incubare depinde de germenii a căror cultivare o urmărim. Majoritatea bacteriilor patogene sunt mezofile, temperatura lor optimă de dezvoltare fiind în jur de 37°C , iar pentru cele saprofite în jur de 28°C . Durata incubării este de asemenea în funcție de specia microbiană. Majoritatea speciilor microbiene dau culturi bine dezvoltate după o incubare de 24 de ore. Unele specii necesită o incubare de câteva zile, iar altele chiar săptămâni sau luni, cum este cazul bacilului tuberculozei.

5. EXAMENUL CARACTERELOR CULTURALE ALE MICROORGANISMELOR

Dezvoltarea germenilor în medii de cultură îmbracă aspecte variate. Câteva dintre acestea constituie caractere de identificare pentru unele specii microbiene.

Pe suprafața bulionului, creșterea bacteriilor poate să prezinte următoarele forme: floculată, inelară, peliculară, membranoasă (fig.15).

În mediile lichide, pentru germenii aerobi, se întâlnesc următoarele aspecte:

- mediul este turbure omogen (de ex. în cazul stafilococului);
- mediul este clar în cele două treimi superioare, cu depozit grunjos sau nisipos pe pereți și la fundul eprubetei (de ex.: în cazul streptococului);
- mediul este clar, cu depozit floconos și aderent la fundul eprubetei (de ex. la bacilul antraxului);
- mediul prezintă un văl subțire la suprafață (de ex. la bacilul difteric);
- mediul prezintă la suprafață o membrană groasă, rugoasă, plisată, restul fiind limpede (de ex. la bacilul tuberculozei);
- mediul prezintă la suprafață o membrană uscată, scuamoasă, încrețită (de ex. la bacilul fânului);
- mediul prezintă un inel aderent de pereții tubului (de ex. la bacilul coli);
- mediul prezintă bule de gaz și un miros fecaloid (de ex. în cazul bacilului coli);
- mediul prezintă un miros de con ars (de ex. la bacilul tetanic);
- mediul poate fi colorat diferit, de ex. în verde albăstrui la bacilul piocianic.

Dacă izolăm coloniile pe medii solide, atunci la examenul macroscopic al acestora trebuie să notăm următoarele aspecte:

- uniformitatea coloniilor;
- mărimea lor;
- forma coloniilor (punctiformă, rotundă, filamentoasă, neregulată, rizoidă, fusiformă) (vezi fig.16).;
- pe secțiune (plată, ridicată, convexă, hemisferică, papilată) (vezi fig. 16);

- aspectul marginilor coloniilor: întregi (regulate), ondulate, lobate, dințate, filamentoase, buclate (fig.16).
- suprafața coloniei, care poate fi bombată, granulară, plată cu depresiune centrală (ombilicată), cu ridicătură centrală (mamelonată), cu ridicătură marginală etc.;
- aspectul suprafeței (lucios, mat, mucoid, granulos, uleios, vitros etc.);
- consistența coloniei (vâscoasă, filantă, friabilă);
- dacă se emulsionează ușor sau nu în ser fiziologic;
- transparența sau opacitatea coloniei;
- apariția unei zone colorate sau incolore în jurul coloniei;
- apariția zonelor de liză într-o cultură densă;
- licheifierea mediului cu gelatină (gelatinoliză).

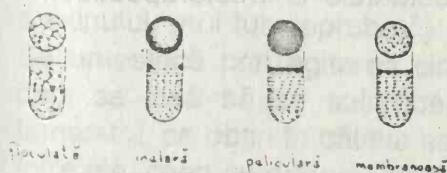


Fig.15. Forma creșterii bacteriilor pe suprafața bulionului

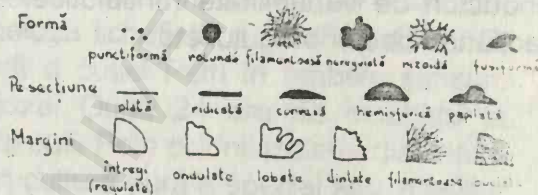


Fig.16. Morfologia coloniilor bacteriene

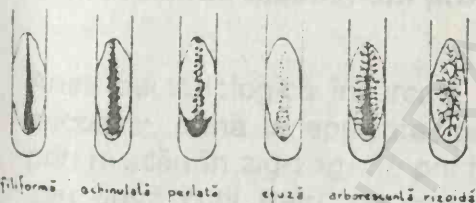


Fig.17. Forma creșterii bacteriilor însămânțate în linie pe geloză nutritivă înclinată

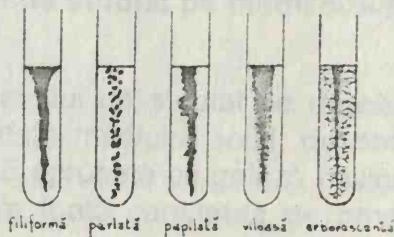


Fig.18. Forma creșterii bacteriilor însămânțate prin întepare pe mediu cu agar drept

Dacă bacteriile se însămânțează în linie pe mediu solid înclinat, forma creșterii acestora poate fi: filiformă, echinulată, perlată, efuză, arborescentă, rizoidă (fig.17).

Dacă bacteriile se însămânțează pe mediu solid prin întepare, forma creșterii acestora este: filiformă, perlată, papilată, viloasă, arborescentă (fig.18).

La germenii anaerobi însămânțați în mediu semisolid (geloză Veillon) în tuburi Weinberg se pot întâlni următoarele aspecte:

- colonii mici lenticulare (forme imobile);
- colonii pufoase difuze (forme mobile);
- apariția bulelor de gaz în masa mediului;
- fragmentarea și ruperea mediului prin formarea masivă de gaze;
- lichefierea parțială sau totală a mediului.

Pe mediile cu sânge, de asemenea, se înregistrează deosebiri culturale însoțite de prezența sau absența hemolizei.

Trebuie subliniat că aceste aspecte culturale menționate mai sus sunt condiționate de numeroși factori: specia microbiană, vârsta culturii, compoziția chimică a germenilor, modul de diviziune a microbilor, calitatea mediilor de cultură, pH-ul mediului, acțiunea unor factori inductori de variabilitate (antibioticele, substanțele chimioterapeutice), acțiunea bacteriofagului etc.

6. TEHNICA IZOLĂRII BACTERIILOR ÎN CULTURI PURE

Pentru a izola o specie bacteriană în cultură pură se folosesc mai multe metode,

6.1. Metoda diluțiilor succesive în medii lichide

O parte din produsul studiat (material patologic, lapte, apă etc.) se diluează în ser fiziologic, apă de robinet fiartă și răcită, soluție de pirofosfat de sodiu sau soluție Ringer sterile. Se execută diluții zecimale (vezi tehnica determinării numărului de microorganisme prin metoda diluțiilor). Din fiecare diluție, începând cu cea mai mare, se ia cu o pipetă gradată sterilă 1 ml de lichid și se repartizează într-o cutie Petri sterilă. În fiecare cutie Petri se toarnă apoi, în condiții de sterilitate, conținutul unui tub (eprubetă) cu geloză lichefiată și răcită la 45-50°C. Se amestecă prin agitarea circulară a cutiei Petri în ambele sensuri, apoi se lasă să se solidifice geloză. După 24 ore de incubare la termostat, se obțin în câteva serii de cutii Petri colonii izolate, distanțate între ele, ceea ce denotă izolarea în cultură pură a speciei sau speciilor microbiene din produsul studiat.

6.2. Metoda diseminării produsului de studiat pe medii solide

Ansa bacteriologică încărcată cu materialul de studiat se descarcă succesiv, până la epuizare, pe suprafața mediului solid, de obicei prin mișcări în zig-zag. Se pot folosi 3-5 eprubete cu geloză înclinată sau două cutii Petri, pe care epuizăm toată cantitatea de produs încărcat pe ansă.

6.3. Metoda asocierii diluțiilor succesive cu diseminarea produsului de studiat

Ansa se încarcă cu produsul de studiat. Apoi se introduce într-o eprubetă cu geloză înclinată și se diluează în lichidul de condensare existent la partea inferioară a gelozei înclinate. După aceea se însămânțează prin epuizarea ansei prin mișcări în zig-zag pe suprafața gelozei. În continuare, se ia o picătură din lichidul de condensare al primei eprubete și se diluează în lichidul de

condensare al eprubetei a doua, însămânțând apoi prin epuizarea ansei pe suprafața gelozei înclinată. Se procedează în acest mod pentru 5 eprubete cu mediu, reușindu-se ca în eprubetele 4 și 5 să se obțină colonii izolate distanțate.

6.4. Metode de izolare bazate pe acțiunea căldurii

Servesc pentru izolarea germenilor sporulați. În acest scop materialul se însămânțează într-un mediu favorabil dezvoltării speciei sporulate. Se încălzește apoi timp de 10 minute la 75-80°C, temperatură care distruge celulele vegetative, fără să fie nocivă pentru spori.

6.5. Metode de izolare prin adaos de substanțe bacteriostatice

La mediu se adaugă unele substanțe, bacteriostatice sau bactericide pentru unele specii, dar inactive pentru specia care trebuie izolată. De exemplu, verdele brilliant, selenitul de Na, tetracionatul de Na favorizează dezvoltarea microbilor din genul *Salmonella* și inhibă microbii din flora de asociație intestinală.

Teluritul de K este metabolizat de bacilul difteric, facilitându-i dezvoltarea, în timp ce flora de asociație din faringe este inhibată.

Acidul sulfuric distruge flora de asociație dintr-un produs patologic cu bacili tuberculoși și permite, după neutralizare, izolarea bacilului tuberculos prin însămânțare pe medii selective.

Fenolul, în concentrațiile obișnuite, inhibă creșterea florei de asociație, dar nu afectează dezvoltarea enterococului (*Str. faecalis*).

Streptococii fecali (enterococii) din apă și alimente etc. pot fi izolați (detectați) pe un mediu nutritiv conținând azidă de sodiu 0,04%.

Clorura de Na, în concentrație ridicată, inhibă dezvoltarea florei de asociație din exudatele rino-faringiene și nazale, permițând astfel izolarea stafilococului patogen și a enterococului.

Antibioticele adăugate în anumite proporții la mediile de cultură inhibă dezvoltarea germenilor sensibili, favorizând în acest fel dezvoltarea germenilor rezistenți. De ex. pentru izolarea agentului tusei convulsive (*Bordetella pertusis*) la mediu de izolare se adaugă penicilină.

6.6. Metode de izolare și identificare bazate pe evidențierea anumitor proprietăți enzimactice

Sunt metode des utilizate în practică. Bacilul coli care se dezvoltă pe mediile cu lactoză, fermentează lactoza cu producere de acid sau/și gaze. Tulpinile de *Salmonella* și *Shigella* nu pot metaboliza lactoza. În acest mod pot fi izolate tulpinile de *E.coli*.

Streptococul hemolitic și stafilococul patogen (*Staphylococcus aureus*) produc hemoliza totală pe mediile geloză-sânge, dispunând de hemolizine caracteristice.

6.7. Metode de izolare și identificare utilizând medii cu un anumit pH

Vibriionul holerici (*Vibrio cholerae*) preferă o zonă alcalină de dezvoltare. Astfel, apa peptonată la un pH aproape de 9 favorizează izolarea vibriionului holerici.

Lactobacilii pot fi izolați pe un mediu cu pH scăzut (5-5,2) care inhibă dezvoltarea multor bacterii.

6.8. Metoda inoculării la animale receptive

Se folosesc în acest scop iepurele, cobaiul și șoarecele alb. Se pot inocula la animale: spută, exudat faringian, sânge, urină etc. Inocularea se face de obicei subcutan, intraperitoneal sau intravenos. Cobaiul este animalul de elecție pentru infecția tuberculoasă, difterie și cărbune, iar șoarecele alb pentru pneumococ, *Klebsiella* etc.

7. EXAMINAREA CARACTERELOR MORFOLOGICE ȘI TINCTORIALE ALE MICROORGANISMELOR

Având dimensiuni foarte reduse, microorganismele nu pot fi văzute cu ochiul liber, ci numai cu ajutorul microscopelor. Prin examenul microscopic se observă forma, modul de grupare, mobilitatea, iar după colorare proprietățile lor tinctoriale și unele detalii de structură. De asemenea, cu ajutorul microscopului se determină și dimensiunile microorganismelor.

Examenul microscopic se poate realiza, la microscopul obișnuit, în 3 feluri: 1 - examinarea microorganismelor în preparate native; 2 - examenul în câmp întunecat și 3 - examinarea microorganismelor pe preparate colorate.

7.1. Examinarea microorganismelor în preparate native

a/. Examenul între lamă și lamelă. Pe o lamă de microscop curată, în prealabil bine degresată cu alcool, se pune cu ajutorul unei pipete Pasteur o picătură din cultura în mediu lichid. Apoi se acoperă cu lamela. Dacă cultura este pe mediu solid, atunci pe lamă se pune o picătură de ser fiziologic steril sau apă de robinet sterilă. Cu ajutorul ansei se recoltează în mod aseptice o cantitate mică din cultura microbiană și se execută o suspensie ușor opalescentă în picătura de pe lamă. Se acoperă apoi cu lamela. Preparatul se examinează la microscop cu obiectivul uscat 40x, după ce în prealabil s-a diminuat luminozitatea prin închiderea diafragmei condensorului. Se coboară cu grijă coloana microscopului până când obiectivul 40x atinge lamela. Apoi se pune la punct imaginea cu ajutorul dispozitivului de reglare fină. Se observă forma, gruparea și mobilitatea bacteriilor.

b/. Colorația vitală. Se execută un preparat între lamă și lamelă conform tehnicii descrise mai sus. La picătura cu suspensia microbiană se mai adaugă o picătură de colorant vital (albastru de metilen 0,02%, roșu neutru 0,02%). Acești coloranți colorează bacteriile și datorită concentrației scăzute nu le omoră. Cele două picături se omogenizează. Se acoperă cu lamela și apoi preparatul se examinează la microscop, cu obiectivul 40x. Această colorație furnizează informații asupra structurii citoplasmei, mai ales asupra incluziilor citoplasmice.

7.2. Examenul în câmp întunecat

Câmpul întunecat se realizează obturând partea centrală a unui condensor cu apertură mare, printr-un ecran discoidal, cu diametrul suficient de mare pentru ca unghiul de descriere a conului de umbră să fie cel puțin egal cu cel al obiectivului folosit. Din cauza oblicității lor, majoritatea razelor luminoase nu ajung în obiectiv și câmpul apare întunecat. Dacă așezăm în locul de încrucișare a razelor un obiect, contururile acestuia, puternic luminate de razele pe care le primește de jur împrejur, vor difracta razele de lumină, obiectul apărând strălucitor pe fondul întunecat.

În cazul obiectivelor cu imersie se pune ulei de cedru între condensor și lamă, realizându-se astfel condițiile unui examen pe câmp (fond) întunecat. Examenul pe fond întunecat este des folosit pentru evidențierea microorganismelor greu vizibile, fie că sunt greu colorabile, fie că sunt foarte mici (leptospire, treponeme, rickettsii etc.).

Unele microscopice au discuri metalice care se aplică pe fața inferioară a condensoului. Dar cele mai bune sunt condensorii paraboloid și cele cardioide. Partea centrală a condensoului este obturată. Ecranul permite trecerea unui inel luminos îngust. Razele sunt reflectate de două ori pe suprafețele sferice și se reunesc într-un punct, de aici provenind și denumirea de condensor cu dublă reflexie pe care o mai poartă.

Executarea examenului. Fixăm un condensor paraboloid sau cardioid în manșonul de metal, înlocuind condensorul obișnuit. Se coboară puțin condensorul, apoi se pune o picătură de ulei de cedru pe lentila superioară. Se pune lama cu preparatul nativ (preparat între lamă și lamelă) și se ridică condensorul încet până când picătura de ulei vine în contact cu fața inferioară a lamei. Se pune la punct imaginea la început cu un obiectiv slab, 10x sau 20x. Dacă oglinda este bine orientată, se vede în mijlocul lamei o pată luminoasă. Această pată, care corespunde sursei de lumină, trebuie să fie adusă, cu ajutorul mișcărilor oglinzii în centrul câmpului, iar prin ușoare mișcări de verticalitate ale condensoului trebuie redusă la minimum. Când imaginea sursei de lumină este centrată și pusă la punct corect, se pune o picătură de ulei de cedru pe lamelă și se examinează cu

obiectivul de imersie (90x). În câmp apar leptospirele sau alte bacterii în alb strălucitor pe un fond întunecat.

Toate condensoarele speciale pentru câmp întunecat au focarul scurt de maximum 1,1 mm și astfel ele nu pot fi folosite decât dacă lamele sunt subțiri de maximum 0,8-1 mm.

7.3. Examinarea microorganismelor pe preparate colorate

Această tehnică prezintă următoarele avantaje:

- a/ microbii sunt omorâți, deci nu prezintă pericol de contaminare;
- b/ preparatele pot fi păstrate timp îndelungat;
- c/ examenul microscopic este mai ușor;
- d/ este mai clară forma și structura microorganismelor
- e/ pot fi evidențiate caracterele tinctoriale ale microorganismelor.

Trebuie să accentuăm că pot să apară și unele modificări în structura microorganismelor în cursul uscării și fixării preparatelor.

Tehnica efectuării preparatelor colorate cuprinde 4 etape:

1 – executarea frotiului; 2 – uscarea; 3 – fixarea și 4 – colorarea.

1. *Executarea frotiului.* Operațiunea de întindere a materialului microbian pe lamă este denumită în mod curent "executarea unui frotiu". Termenul de frotiu este utilizat pentru desemnarea lamei de microscop cu materialul microbian etalat pe suprafața ei. În vederea executării frotiului se întinde materialul de examinat (cultură microbiană, produsul de examinat) pe suprafața unei lame de microscop, în prealabil degresată. Etalarea (întinderea) materialului se face pe o suprafață de 2 cm², care să cuprindă centrul lamei și să nu atingă marginile. Din culturi pe medii lichide, se ia o picătură din lichidul de cultură, fie cu o pipetă Pasteur, fie cu ansa de însămânțare și se depune pe mijlocul lamei. Lichidul este apoi întins într-un strat subțire, pe o suprafață de circa 2 cm², în funcție de densitatea microbilor în lichidul examinat.

Din culturile pe medii solide se ia cu ansa o cantitate mică din colonia bacteriei de examinat și se pune într-o picătură de ser fiziologic sau apă de robinet sterilizată, care se găsește pe mijlocul lamei de microscopie. Cu ajutorul ansei se execută o suspensie ușor opalescentă a bacteriei de examinat în picătura de ser fiziologic sau apă de robinet. Apoi materialul astfel suspendat în ser fiziologic sau apă se întinde pe o suprafață de circa 2 cm².

2. **Uscarea.** Se execută la aer. Ea se desfășoară încet, pentru a nu modifica forma și aspectul microorganismelor.

3. **Fixarea.** Prin fixare se produce o denaturare a proteinelor microbiene, care în final duce la moartea microorganismelor. Ca urmare a acestui fapt se înlătură pericolul de infecție (în cazul microorganismelor patogene) pe de o parte, iar pe de altă parte fixarea face ca preparatul să adere de lamă, pentru a nu fi spălat de diferite soluții folosite pentru colorare. Există mai multe procedee de fixare, în mod curent utilizându-se doar trei.

a). **Fixarea prin căldură** (tehnica lui Koch). Se face trecând frotiul uscat de trei ori prin flacăra unui bec de gaz, cu fața opusă celei pe care este întins materialul microbial. Trecerea să nu dureze mai mult de câteva secunde (5-7 secunde).

b). **Fixarea prin alcool-flambare.** Pe frotiul uscat se pun 1-2 picături de alcool etilic sau alcool-acetonă (1:1), după care se aprinde și se lasă să ardă tot conținutul, proces ce trebuie să dureze câteva secunde.

c). **Fixarea cu lichide fixatoare.** Drept lichide fixatoare se folosesc: alcoolul metilic, alcoolul etilic, amestecul de alcool etilic și eter în proporție de 1:1. Acestea se țin pe lamă timp de 10-20 de minute. Preparatul se spală apoi cu apă.

4. **Colorarea.** Protiurile fixate se colorează prin mai multe metode:

- a) metode de colorare simplă;
- b) metode de colorare dublă;
- c) metode de colorare speciale.

7.3.1. Colorația simplă

Oferă posibilitatea de a studia rapid și ușor morfologia microorganismelor. Ea se poate executa cu albastru de metilen sau cu fucsina Pfeiffer.

7.3.1.1. **Colorația simplă cu albastru de metilen.** Se folosește albastru de metilen fenicat 1%. Soluția de colorant se prepară din:

Albastru de metilen cristale	1 g
Fenol pur cristale	2 g
Alcool etilic 96°	10 ml
Apă distilată	100 ml

Modul de preparare este următorul: se mojarează substanța colorantă și se amestecă cu alcoolul etilic. Se adaugă fenolul și o parte din apa distilată. Se mojarează apoi din nou. Conținutul

mojarului se toarnă apoi într-o pâlnie. Cu apa rămasă se spală mojarul și se transpune în sticlă. Se pune la termostat, la 37°C pentru 24 de ore. După 24 de ore, soluția de colorant se filtrează, putându-se utiliza pentru colorarea preparatelor microbiene.

În cazul colorației simple, frotiul uscat și fixat la flacără se acoperă cu soluția de albastru de metilen fenic 1%. Colorantul se ține pe lamă timp de 2-5 minute. Apoi colorantul se varsă, iar lama cu frotiul se spală cu apă de robinet. Preparatul se usucă la aer după care se examinează la microscop. Se utilizează obiectivul cu imersie (90x). În acest scop, pe mijlocul frotiului se pune o picătură de ulei de cedru. Se coboară apoi coloana microscopului până când obiectivul 90x atinge picătura de ulei. Se pune apoi la punct imaginea utilizând dispozitivul de reglare fină. Microorganismele apar colorate în albastru.

7.3.1.2. Colorația simplă cu fucsină Pfeiffer. Frotiul uscat și fixat la flacără se acoperă cu fucsină Pfeiffer (fucsină Ziehl¹ diluată în proporție de 1:10 cu apă distilată). Durata colorării este de 2-3 minute. Coloratul se varsă, lama se spală cu apă. Se usucă și se examinează la microscop, folosind obiectivul 90x. Microorganismele apar colorate în roșu.

7.3.2. Colorația dublă

7.3.2.1. Colorația Gram

Are cea mai largă utilizare în microbiologie. Se întrebuintează în scop de diagnostic, servind drept primă etapă în determinarea bacteriilor.

Principiul metodei. Frotiul bacterian fixat la flacără se colorează cu un colorant bazic violet (violet de metil, cristal violet, violet de gențiană), apoi se mordansează cu soluție Lugol, se decolorează cu alcool-acetonă și se recolorează cu un colorant bazic roșu (fucsină Pfeiffer, safranină). Din punctul de vedere al colorației Gram, tulpinile bacteriene pot fi: Gram-pozitive, Gram-negative și Gram-variabile. Bacteriile Gram pozitive se colorează în violet deoarece ele nu-și pierd colorantul violet în cursul decolorării. Cele Gram-negative se colorează în roșu, pentru că în cursul decolorării pierd colorantul violet și se recolorează apoi cu colorantul roșu. Bacteriile Gram variabile pot fi atât Gram-pozitive cât și Gram-negative. Pozitivitatea colorației Gram este foarte rar întâlnită în afara bacteriilor. Se mai colorează pozitiv numai

¹ Prepararea fucsinei Ziehl este redată la pag.64.

celulele vegetative și ascosporii drojdiilor, unii spori și granulațiile din miceliile diferitelor ciuperci. Celulele plantelor superioare și ale animalelor sunt Gram-negative.

Materialul necesar.

- Violet de metil, soluție apoasă 0,2%
- Fucsină Pfeiffer
- Alcool-acetonă 9:1 (9 părți alcool etilic 96° și o parte acetonă)
- Soluție Lugol, care are următoarea compoziție:

J₂ 1 g

KJ 2 g

Apă distilată 200 ml

Tehnica de lucru.

Se prepară un frotiu din cultura bacteriei de studiat. Se usucă la aer. Se fixează la flacără. Colorația Gram se execută în 4 etape.

1. *Colorarea.* Frotiul se acoperă cu violet de metil. Se ține 1-2 minute colorantul pe lamă, după care se varsă și preparatul se spală cu apă.

2. *Mordansarea.* Frotiul fără a fi uscat se acoperă cu soluție Lugol. Se ține câteva secunde (3-5 secunde). Mordantul se varsă și se adaugă din nou când se lasă pe lamă 4-5 minute. Se varsă soluția Lugol, dar frotiul nu se spală cu apă.

3. *Diferențierea sau decolorarea.* Lama se acoperă cu alcool-acetonă, înclinându-se puțin pentru a ușura scurgerea decolorantului. Se decolorează până când colorantul de pe lamă nu mai trece în soluție. Frotiul devine alburui. Apoi preparatul se spală repede cu apă pentru a opri acțiunea decolorantului.

4. *Recolorarea.* Se face cu fucsină Pfeiffer sau cu soluție de safranină (soluție apoasă 0,5%). Durata recolorării este de 1-2 minute. Colorantul se varsă și lama se spală cu apă de robinet. După uscare se examinează la microscop, folosind obiectivul cu imersie. Bacteriile Gram-pozitive se vor colora în violet-închis, iar cele Gram negative în roșu.

7.3.2.2. Colorația Ziehl-Neelsen

Este o metodă dublă (diferențială) de colorare. Se folosește pentru determinarea alcool-acidorezistenței tinctoriale sau a acidorezistenței tinctoriale a bacteriilor.

Principiul metodei. Bacteriile acidorezistente, respectiv alcool-acido rezistente se colorează foarte greu, de aceea se aplică soluții de colorant concentrate și încălzite. Însă odată colorate.

aceste bacterii nu se decolorează sub acțiunea acizilor, respectiv a alcoolilor. Această acidorezistență tinctorială denotă rezistența lor la decolorare.

Materialul necesar:

- Fucsină Ziehl, care se prepară din:

- | | |
|---------------------|--------|
| - Fucsină bazică | 1 g |
| - Fenol cristale | 5 g |
| - Alcool etilic 96° | 10 ml |
| - Apă distilată | 100 ml |

Se triturează într-un mojar colorantul cu alcoolul, apoi se adaugă fenolul și o parte din apa distilată. Se agită ușor. Soluția de colorant se transpune într-un vas. Cu apa rămasă se spală mojarul și apoi se adaugă colorantului din vas. Soluția de colorant se ține pe urmă 24 de ore la 37°C, după care se filtrează prin hârtie de filtru.

-H₂SO₄ 1:4 (o parte acid sulfuric concentrat și 4 părți apă distilată; se va turna acidul peste apă).

- Alcool etilic 96°
- Albastru de metilen fenicat 1%

Tehnica de lucru:

Se prepară un frotiu dintr-o cultură de micobacterii. Se usucă și apoi se fixează la flacără. Colorația Ziehl-Neelsen cuprinde 3 etape:

1. *Colorarea.* Lama se acoperă cu fucsină Ziehl. Se încălzește ușor, cu ajutorul unui bec de gaz, până la emiterea de vapori. Încălzirea durează 10 minute, timp în care trebuie să se emită de 3 ori vapori. Trebuie avut în vedere ca frotiul să fie acoperit tot timpul cu colorant. Se va evita încălzirea până la fierberea colorantului. Colorantul apoi se varsă, iar lama se spală cu apă.

2. *Decolorarea sau diferențierea.* Se efectuează cu H₂SO₄ 1:4. Se adaugă acid diluat pe lamă care se ține 1-2 minute. Se spală lama apoi cu apă de robinet. Decolorarea se continuă cu alcool etilic 96° până la îndepărtarea completă a colorantului (frotiul trebuie să devină alb-roziu). Decolorantul se varsă și lama se spală cu apă de robinet.

3. *Recolorarea.* Se face cu albastru de metilen fenicat 1%. Durata recolorării este de 1-2 minute. Colorantul apoi se varsă și lama se spală cu apă.

După uscare se examinează la microscop, utilizând obiectivul 90x. Bacteriile alcoolo-acidorezistente se colorează în roșu, iar cele

nealcoolo-acidorezistente (precum și fondul preparatului) se colorează în albastru.

Metoda se folosește pentru punerea în evidență a bacteriilor din genul *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. paraffinicum*).

Pe lângă speciile de *Mycobacterium* și speciile de *Nocardia* sunt acido-rezistente. Restul bacteriilor sunt nealccolo- acidorezistente.

8. DETERMINAREA DIMENSIUNILOR MICROORGANISMELOR

Pentru aprecierea dimensiunilor microorganismelor se pot folosi două metode: 1. Metoda comparării cu elemente de dimensiuni cunoscute și 2. Metoda măsurării cu micrometrul ocular.

8.1. Metoda comparării cu elemente de dimensiuni cunoscute

Această metodă se aplică mai ales în cazul bacteriilor. Compararea se face cu eritrocite, al căror diametru este $7,7 - 8 \mu\text{m}$. Se amestecă în acest scop materialul bacterian cu o picătură de sânge proaspăt. Din amestec se execută frotiuri care se colorează cu soluție Giemsa. După uscare se examinează la microscop. Se compară dimensiunile bacteriei urmărite, cu cele ale eritrocitelor. Această metodă are un grad mare de aproximație și nu poate fi folosită decât cu caracter orientativ.

8.2. Metoda măsurării cu micrometrul ocular

Această metodă este mai bună și se recomandă când sunt necesare aprecieri mai exacte. Pentru o determinare avem nevoie întotdeauna de 2 micrometre: un micrometru ocular și un micrometru obiectiv.

Tehnica de lucru

Se deșurubează lentila superioară a sistemului ocular și se introduce micrometrul ocular cu fața gravată în jos, apoi lentila superioară a ocularului se înșurubează la loc. Micrometrul ocular este un disc de sticlă pe care este gravată o scară micrometrică de 5 mm lungime, cu 50 de diviziuni de câte $0,1 \text{ mm}$ sau o scară de 10 mm divizată în 100 părți. Pe platina microscopului se așează micrometrul obiectiv. Micrometrul obiectiv este o lamelă pe care este gravată o scară milimetrică de 1 mm divizată în 100 părți sau de 2 mm divizată în 200 părți. Astfel fiecare interval este de $1/100 \text{ mm}$, respectiv corespunde la 10 micrometri. Această lamelă este fixată pe o lamă de microscopie. În continuare cu un obiectiv uscat se centrează scara micrometrului obiectiv. Apoi se examinează cu obiectivul de imersie. Este bine să se lucreze cu microscopae, al căror tub are lungimea de 160 mm . Micrometrele se reglează în așa fel încât liniile zero ale celor

două scări să se suprapună. Apoi se observă și se notează care din diviziunile celor două micrometre se suprapun. Valorile găsite la micrometrul obiectiv se înmulțesc cu 10 (valoarea în micrometri a unei diviziuni) și se împart apoi la valorile corespunzătoare de pe scara micrometrului ocular.

Dăm un exemplu. Să presupunem că diviziunea 20 a micrometrului ocular se suprapune peste diviziunea 2 a micrometrului obiectiv. Știind că o diviziune a micrometrului obiectiv este egală cu 10 micrometri, reiese că cele 20 de diviziuni ale micrometrului ocular corespund la 20 de micrometri, deci o diviziune a micrometrului ocular este de $20:20 = 1 \mu\text{m}$.

Cifra obținută reprezintă valoarea în micrometri a unei diviziuni din scara gradată a micrometrului ocular.

După ce s-a stabilit această valoare se scoate micrometrul obiectiv de pe platina microscopului și se examinează frotiul cu bacteriile ale căror dimensiuni se determină cu ajutorul micrometrului ocular. Se apreciază numărul de diviziuni din micrometrul ocular pe care îl ocupă o celulă bacteriană. În acest scop lentila ocularului se rotește în așa fel încât scara gradată a micrometrului să se suprapună peste diametrul transversal sau longitudinal al bacteriei. Cifra obținută reprezintă dimensiunea în micrometri.

Pentru a determina dimensiunile microorganismelor cu precizie este necesar să se stabilească valoarea în micrometri a unei diviziuni de pe micrometrul ocular pentru fiecare combinație de lentile (oculare+obiective). Pentru o combinație de lentile se fac cel puțin 50 de măsurători la microscop.

Pentru a urmări gradul de variabilitate în cadrul unei populații de celule se aplică coeficientul de variație (variabilitate).

Coeficientul de variație este raportul dintre devierea standard și media aritmetică:

$$V = \frac{s}{\bar{x}}; \bar{x} \neq 0$$

Poate fi exprimat și în procente:

$$V = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

unde V = coeficientul de variație;

s = devierea standard;

$\bar{x}$ = media aritmetică;

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + \dots + x_n)$$

unde: n = numărul valorilor individuale (numărul celulelor numărate)
 $x_1, x_2, \dots, x_n$ = valorile individuale (lungimile și grosimile stabilite)

$X_1, X_2, \dots, X_n$ = valorile individuale (lungimile și grosimile stabilite)

$$s = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Tabelul 2.

Calcularea coeficientului de variație

n	x	$\bar{x}$	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$	s	V%
Σ				$\Sigma(x - \bar{x})^2$		

9. TEHNICA DETERMINĂRII NUMĂRULUI DE BACTERII DINTR-UN ANUMIT PRODUS

Determinarea numărului de bacterii dintr-un produs (apă, sol, aer, lapte, carne, cultură bacteriană, vaccin etc.) este necesară adeseori și se poate executa prin metoda culturilor în plăci, prin calcularea numărului celui mai probabil de bacterii în mediu lichid și prin metoda nefelometrică.

9.1. Metoda culturilor în plăci

Din materialul de examinat (apă, sol, carne, lapte etc.) se fac diluții zecimale (din 10 în 10).

Descriem *prepararea diluțiilor de sol*. Pe o sticlă de ceas sterilă se cântărește 1 g de sol. Solul se ia cu o spatulă sterilizată la flacăra și apoi răcită. Se introduce apoi într-o eprubetă cu 9 ml apă de robinet sterilizată sau ser fiziologic steril (sterilizarea s-a efectuat la 120°C, timp de 30 de minute). Apa de robinet utilizată pentru prepararea diluțiilor se fierbe în prealabil pentru a îndepărta urmele de clor gazos. În continuare, amestecul de 1 g sol+9 ml apă de robinet sau ser fiziologic se agită bine timp de 5 minute. Înainte de a se agita se schimbă dopul de vată al eprobetei cu un dop de cauciuc steril. Prin agitare se obține diluția $1/10 = 10^{-1}$. Din diluția 10^{-1} se ia cu o pipetă gradată sterilă 1 ml de lichid și se introduce într-o altă eprubetă cu 9 ml apă de robinet sterilă sau ser fiziologic. Obținem, prin agitare ușoară diluția $1/100 = 10^{-2}$. Se aspiră lichid în pipetă din diluția 10^{-2} și se lasă să curgă înapoi în eprubetă. Această operație se mai repetă de două ori. După aceea se aspiră 1 ml și se pipetează într-o altă eprubetă care conține 9 ml sau ser fiziologic steril. Obținem diluția $1/1000$, adică 10^{-3} . În continuare se procedează ca și la diluția anterioară și se obțin diluțiile 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} și 10^{-7} .

Dacă se lucrează cu carne, în loc de 1 g sol se utilizează 1 g de carne, care se mojară ușor într-un mojar steril în 9 ml apă sterilă. Pentru determinarea numărului de bacterii din lapte, apă, cultură bacteriană sau vaccin, pentru prepararea diluțiilor se pleacă de la 1 ml din fiecare material.

Pentru executarea diluțiilor se poate utiliza o singură pipetă gradată sterilă pentru toată seria de diluții, sau pentru fiecare diluție se utilizează o pipetă gradată sterilă.

Din diluțiile executate se fac însămânțări în plăci (cutii) Petri. În acest scop din fiecare diluție (începând de la diluția cea mai mare) se ia 1 ml care se introduce în mod aseptik într-o placă Petri. Pentru obținerea de rezultate mai exacte se recomandă să se însămânțeze câte două plăci Petri pentru fiecare diluție. În fiecare placă se toarnă apoi 20 ml geloză simplă lichefiată și răcită la 45-50°C. Se omogenizează bine (prin mișcări de rotație), astfel ca bacteriile să se răspândească uniform, în vederea obținerii de colonii izolate. Se consideră că o colonie izolată este rezultatul multiplicării unei singure celule bacteriene. După solidificarea mediului, plăcile se pun la incubat timp de 24-48 de ore, fie la 28°C, fie la 37°C. Coloniile care au apărut se pot număra direct sau cu ajutorul lupei. Dacă numărul coloniilor este foarte mare, acestea se numără cu ajutorul unor plăci prevăzute cu o rețea de patrate, gravată pe sticlă. În mod curent se folosesc plăcile Lavar și Wolfhügel (fig. 19).

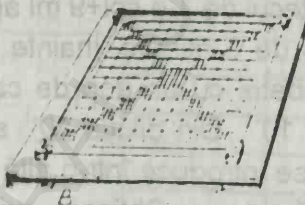
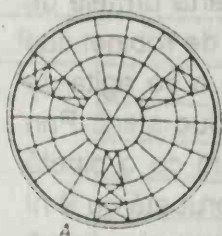


Fig. 19. Plăci utilizate pentru numărarea coloniilor bacteriene. A: placă Lavar. B: placă Wolfhügel.

Placa Lavar este de forma unui cerc și cuprinde 6 sectoare, fiecare subdivizat în câte 10 suprafețe de 1 cm². Placa Wolfhügel este împărțită în 144 suprafețe a 1 cm².

Când se utilizează una din cele două plăci arătate mai sus, se procedează în felul următor: placa se introduce sub cutia Petri și se numără coloniile din 10-20 suprafețe de 1 cm². Apoi se face media pentru 1 cm². Pentru aflarea numărului total de colonii din cutia Petri se înmulțește numărul găsit pe 1 cm² cu suprafața plăcii.

Pentru a se afla numărul de germeni din materialul examinat se înmulțește numărul coloniilor dintr-o placă (cutie) Petri cu valoarea inversă a diluției respective. De exemplu, dacă în placa însămânțată

cu 1 ml din diluția 10^{-6} s-au găsit 20 de colonii, atunci numărul total de germeni va fi 20×10^6 .

9.2. Determinarea numărului celui mai probabil de bacterii

În cazul acestei metode se folosește mediul de cultură lichid. Metoda dă rezultate bune mai ales pentru determinarea bacteriilor din anumite grupe fiziologice (nitrificatoare, denitrificatoare, celulolitice, desulfificatoare etc.), dar se aplică cu succes și pentru determinarea microflorei totale.

Se pleacă tot de la diluțiile zecimale obținute din materialul de studiat în apă de robinet sterilă sau ser fiziologic steril. Menționăm că pentru obținerea diluțiilor în afară de apa de robinet sau ser fiziologic se mai pot utiliza: bulionul de carne steril și pirofosfatul de sodiu ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$) soluție 0,5 M, sterilizate tot la 120°C , timp de 30 de minute.

Din fiecare diluție se însămânțează 5 eprubete cu mediu lichid (pentru microflora totală se utilizează de obicei mediul Thornton). Volumul inoculului este de 1 ml. Vor exista întotdeauna și 5 eprubete martor, cu mediu lichid neinoculate. După incubare se trece la citirea probelor. În cazul determinării microflorei totale o eprubetă este considerată pozitivă dacă mediul a devenit opalescent. În cazul grupelor fiziologice de bacterii se analizează în fiecare eprubetă produsul tipic de reacție. Rezultatele obținute se prelucrează cu ajutorul tabelului statistic (Alexander, 1965) (tabelul 3), calculând numărul cel mai probabil de bacterii într-un ml sau g din materialul studiat. Diluțiile se vor efectua până când nu toate eprubetele de la aceeași diluție vor fi pozitive.

Pentru calcularea rezultatelor se vor folosi valorile de la 3 diluții succesive. Dăm un exemplu. Să presupunem că la diluția 10^{-4} am obținut 5 probe (eprubete) pozitive, la diluția 10^{-5} – 4 probe pozitive, iar la diluția 10^{-6} – 2 probe pozitive. În acest caz, valoarea lui $P_1=5$, valoarea lui $P_2=4$ și valoarea lui $P_3=2$.

Tabelul 3

Tabel cu numerele cele mai probabile (Alexander, 1965)

P ₁	P ₂	Numărul cel mai probabil P ₃					
		0	1	2	3	4	5
0	0	-	0,018	0,036	0,054	0,072	0,090
0	1	0,018	0,036	0,055	0,073	0,091	0,11
0	2	0,037	0,055	0,074	0,092	0,11	0,13
0	3	0,056	0,074	0,093	0,11	0,13	0,15
0	4	0,075	0,094	0,11	0,13	0,15	0,17
0	5	0,094	0,11	0,13	0,15	0,17	0,19
1	0	0,020	0,040	0,060	0,080	0,10	0,12
1	1	0,040	0,061	0,081	0,10	0,12	0,14
1	2	0,061	0,082	0,10	0,12	0,15	0,17
1	3	0,083	0,10	0,13	0,15	0,17	0,19
1	4	0,11	0,13	0,15	0,17	0,19	0,22
1	5	0,13	0,15	0,17	0,19	0,22	0,24
2	0	0,045	0,068	0,091	0,12	0,14	0,16
2	1	0,068	0,092	0,12	0,14	0,17	0,19
2	2	0,093	0,12	0,14	0,17	0,19	0,22
2	3	0,12	0,14	0,17	0,20	0,22	0,25
2	4	0,15	0,17	0,20	0,23	0,25	0,28
2	5	0,17	0,20	0,23	0,26	0,29	0,32
3	0	0,078	0,11	0,13	0,16	0,20	0,23
3	1	0,11	0,14	0,17	0,20	0,23	0,27
3	2	0,14	0,17	0,20	0,24	0,27	0,31
3	3	0,17	0,21	0,24	0,28	0,31	0,35
3	4	0,21	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40
3	5	0,25	0,29	0,32	0,37	0,41	0,45
4	0	0,13	0,17	0,21	0,25	0,30	0,36
4	1	0,17	0,21	0,26	0,31	0,36	0,42
4	2	0,22	0,26	0,32	0,38	0,44	0,50
4	3	0,27	0,33	0,39	0,45	0,52	0,59
4	4	0,34	0,40	0,47	0,54	0,62	0,69
4	5	0,41	0,48	0,56	0,64	0,72	0,81
5	0	0,23	0,31	0,43	0,58	0,76	0,95
5	1	0,33	0,46	0,64	0,8	1,1	1,3
5	2	0,49	0,70	0,95	1,2	1,5	1,8
5	3	0,79	1,1	1,4	1,8	2,1	2,5
5	4	1,3	1,7	2,2	2,8	3,5	4,3
5	5	2,4	3,5	5,4	9,2	16,0	-

Căutăm în tabel valoarea lui P_1 până ajungem la coloana 5, apoi căutăm la P_2 până întâlnim cifra 4 și la P_3 în coloana 2 pe aceeași linie cu valorile de la P_1 și P_2 vom întâlni valoarea de 2,2. Această cifră se va înmulți cu valoarea inversă a diluției mijlocii (în cazul nostru cele 3 diluții au fost 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ; deci diluția mijlocie este 10^{-5}). Așadar cifra 2,2 se va înmulți cu 10^5 . Vom obține 220.000 de bacterii/1 ml apă sau la 1 g de sol etc.

9.3. Metoda nefelometrică

Pentru a stabili numărul de germeni dintr-o cultură sau suspensie microbiană, se compară turbiditatea acesteia cu turbiditatea unor diluții standard de germeni sau cu turbiditatea unor pulberi inerte (clorură de bariu, sticlă Pyrex pisată). O largă întrebuințare în numărarea germenilor prin metoda nefelometrică o au scările McFarland și Brown.

10. STUDIAREA STRUCTURII CELULARE A MICROORGANISMELOR

10.1. Evidențierea nucleului

10.1.1. Metoda Robinow.

1. Frotiu efectuat dintr-o cultură de *Bacillus subtilis* pe mediu solid, incubată timp de 20 de ore la 30°C.
- 2a. Fixarea frotiului cu vapori de acid osmic 2% pus într-o sticlă de ceas care se așează într-un vas de sticlă ce poate fi acoperit ermetic cu o placă de sticlă. Lama cu frotiul spre acidul osmic se așează pe sticla de ceas (vezi fig. 20), Durata fixării este de 1-3 minute:

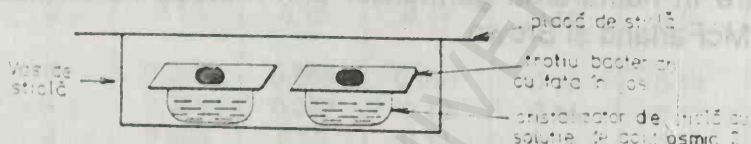


Fig.20. Fixarea cu acid osmic



Fig.21. Fixarea cu alcool etilic

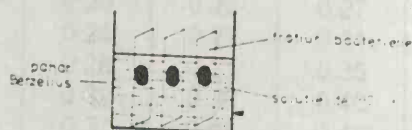


Fig.22. Tratarea frotiului cu HCl N

- 2b. Fixarea suplimentară cu alcool etilic de 90°, durata fiind de 20 minute (alcoolul se introduce într-un pahar, la fel și lama cu frotiul) (vezi fig. 21).
- 2c. Evaporarea alcoolului (lama se scoate din vas și se lasă pe un suport de cupru pentru uscare la aer).
3. Hidroliza cu HCl 1 N pentru îndepărtarea ARN, care maschează colorarea ADN, în cursul colorării cu coloranți bazici. La frotiul de *Bac. subtilis*, tratamentul cu HCl este de 7 minute (v. fig.22).

4. Spălarea frotiului cu apă într-un pahar Berzelius, apa schimbându-se de două ori.
5. Se prepară o diluție de soluție Giemsa, folosind soluția comercială. Pentru evidențierea nucleului bacterian soluția Giemsa se diluează cu apă distilată alcalinizată la pH 7,2. În acest scop, la 200 ml apă distilată se adaugă o picătură dintr-o soluție apoasă de roșu neutru 0,5%. Apa distilată fiind ușor acidă din cauza CO_2 absorbit din aer, se colorează în roșu. Pentru alcalinizare se adaugă câteva picături dintr-o soluție de Na_2CO_3 1%. Apoi se omogenizează prin agitare după adăugarea fiecărei picături de soluție de Na_2CO_3 . Când colorația roșie dispare și nu reapare în 3 minute, alcalinizarea apei distilate este terminată. La 19 ml apă distilată alcalinizată se pipetează 1 ml soluție Giemsa. Urmele de roșu neutru din soluția Giemsa diluată nu afectează colorația bacteriilor, a frotiului deja tratat cu HCl 1 N la 60°C.
6. Lama se colorează cu soluția Giemsa diluată, timp de 1-3 minute.
7. Lama se spală cu apă de robinet, se usucă la aer și se examinează la microscop cu obiectivul de imersie.

Rezultatul este următorul: nucleul bacterian se colorează în roșu-violaceu, având de obicei o poziție bipolară, iar citoplasma bacteriană se colorează în roz.

Indicații suplimentare

Soluția Giemsa se poate prepara din:

Azur II eozină	3 g
Azur II	0,8 g
Glicerol	125 g
Alcool metilic	375 ml

Glicerolul încălzit la 60°C se folosește pentru dizolvarea celor doi coloranți. Se încălzește amestecul din nou la 60°C, se adaugă alcoolul metilic. Se agită. Amestecul se lasă 24 de ore la temperatura camerei pentru maturare, după care se filtrează prin hârtie de filtru.

Azur II – colorant acid

Eozina – colorant acid

Azur II – Azur I și albastru de metilen

Azur I este produsul de oxidare a albastrului de metilen, prin fierbere îndelungată sau prin încălzirea soluției de albastru de metilen, la care s-a adăugat NaOH.

Azur II – eozină → sare eozinat de Azur II, care prin disociere produce anionul eozinat și cationul azur II.

10.1.2. Evidențierea nucleului după Drows

O suspensie de spori de *Bacillus subtilis* se întinde pe suprafața unei plăci cu agar nutritiv și apoi placa astfel însământată va fi introdusă în termostat la 30°C, pentru două ore. Apoi o lamă de microscop bine degresată se aplică pe suprafața mediului și cu ajutorul unei pensete se ridică. O cantitate de spori rămân aderenți la lamă. Preparatul astfel executat, încă umed, se fixează două minute cu vapori de acid osmic.

Hidroliza și colorarea. După fixare și uscare, preparatul este supus unei hidrolize cu HCl N timp de 5 minute la 60°C. Apoi lamele se spală timp de câteva minute într-o baie cu apă distilată schimbându-se de două ori apa. În continuare lamele se introduc într-o baie de colorare, unde se țin 90-120 de minute. Soluția de colorant este compusă din: azur I, soluția apoasă 0,25% la care se adaugă clorură de tionil (2-3 picături clorură de tionil pentru fiecare 10 ml soluție de azur I). Soluția de colorant se folosește întotdeauna proaspăt preparată. După colorare lamele se spală bine cu apă de robinet, iar după uscare se examinează la microscop. Se folosește obiectivul 90x. În celulele necolorate se recunosc corpusculii cromatinici puternic colorați în albastru.

10.1.3. Evidențierea nucleului bacterian la microscopul cu fluorescență

Se execută un preparat conform tehnicii descrise mai sus. După uscare, se acoperă cu o picătură foarte mică de acridinoranj, soluție 0,002%. Se acoperă cu lamela. Se studiază la microscopul cu fluorescență. Pentru aceasta se pune o picătură de ulei de cedru pe lentila condensorului peste care se așează lama cu preparatul și o picătură de ulei de cedru pe lamelă în care se va coborî obiectivul 90x. Pentru o examinare mai bună se vor folosi filtrele albastru și portocaliu. Regiunea nucleară produce o fluorescență verde puternică, iar restul celulei un verde slab (deschis).

10.1.4. Evidențierea nucleului la drojdii (după Bradshaw)

Material necesar:

- Cultură tânără (6-12 ore) de *Saccharomyces cerevisiae* crescută pe mediul Sabouraud (agar înclinat);
- Soluție de alcool etilic 40%
- Soluție de KOH 0,1 N
- Albastru de toluidină, soluție 0,1 % în alcool etilic 10%
- Soluție de alcool etilic 10%.

Tehnica de lucru

Se prepară un frotiu semidens din celule de drojdii suspendate în apă de robinet și se lasă să se usuce la aer. Foarte atent se fixează prin căldură (o fixare slabă). Se acoperă lama cu alcool etilic 40% timp de 1 minut și apoi se spală cu apă de robinet. În continuare frotiul se acoperă cu soluție de KOH 0,1 N și se lasă să acționeze timp de o oră. În caz de evaporare se completează cu soluție proaspătă. Apoi se spală bine cu apă de robinet și se adaugă pe lamă soluția de albastru de toluidină 0,1 %, care se ține 2 minute. Se spală colorantul de pe lamă cu alcool etilic 10%, se scurge bine și apoi se usucă la aer.

Se prepară un al doilea frotiu în același mod cu cel descris mai sus, la care nu se aplică tratamentul cu alcool etilic 40% și cel cu KOH 0,1 N. Se aplică tratamentul cu albastru de toluidină timp de 2 minute și se procedează ca și în cazul primului frotiu. Preparatul al doilea va indica dacă hidroliza în prealabil a ARN prin tratamentul cu KOH este necesară înainte de aplicarea colorantului.

Nucleii se colorează în albastru închis sau trandafiriu în timp ce citoplasma apare pal sau puțin colorată în trandafiriu.

10.2. Evidențierea volutinei

Volutina este o incluzie citoplasmatică, bogată în N și P, constituind o sursă de energie pentru procesele de fosforilare. Ea are uneori în interiorul celulei microbiene o dispoziție specială sub formă de corpusculi. Pentru punerea ei în evidență s-au descris mai multe metode.

10.2.1. Metoda Neisser

Material necesar.

1. – Colorantul Neisser, care constă din două soluții:

Soluția A formată din:

Albastru de metilen	1 g
Alcool etilic 95°	20 ml
Acid acetic glacial	50 ml
Apă distilată	100 ml

Soluția B, formată din:

Cristal violet	1 g
Alcool etilic 95°	10 ml
Apă distilată	300 ml

În momentul întrebuințării se amestecă 2 părți soluție A cu o parte soluție B,

2. – Soluție Lugol-lactat, care se prepară din 100 ml soluție Lugol folosită la colorația Gram + 1 ml acid lactic sau acid acetic glacial.
3. – Soluția de crizoidină 1 % sau soluție de vezuvină 0,2%;
4. – Culturi tinere de 18-20 ore de *Pasteurella multocida* sau *Corynebacterium diphtheriae*.

Tehnica de lucru

Se execută un frotiu bacterian din cultura bacteriilor amintite. După uscare și fixare la flacără, se colorează cu colorantul Neisser timp de 1-2 minute. Se spală cu apă și apoi se tratează cu soluție Lugol lactat timp de 30 de secunde. Frotiul se spală din nou și se colorează apoi cu crizoidină sau vezuvină, timp de 30 de secunde. Preparatul astfel colorat se spală și se examinează cu imersie. Volutina se colorează în albastru, iar restul celulei în galben brun.

10.2.2. Metoda Albert

Material necesar

1. Colorant Albert, care are următoarea compoziție:

Albastru de toluidină	0,15 g
Verde de metil	0,20 g
Acid acetic glacial	1 ml
Alcool etilic 95°	2 ml
Apă distilată	100 ml

Se dizolvă albastru de toluidină și verdele de metil în apă distilată. Apoi se adaugă acidul acetic glacial și alcoolul etilic. Se amestecă bine.

2. Soluție Lugol, care are următoarea compoziție:

J ₂	5 g
KJ	10 g
Apă distilată	100 ml

3. Culturi bacteriene tinere de 18-24 ore, pe agar înclinat.

4. Infuzie de fân. Aceasta se obține dintr-o mână de resturi organice (iarbă cosită, paie sau frunze uscate) care se pune într-un vas cu apă de robinet. Vasul se închide cu un dop de vată. Se lasă la temperatura camerei sau la 37°C, timp de 5 zile. Din când în când se barbotează aer cu ajutorul unui tub de cauciuc. De asemenea se mai poate introduce și extract de carne pentru a favoriza dezvoltarea microorganismelor. În infuzia de fân sunt prezente, aproape întotdeauna, bacterii spiralate foarte bogate în volutină.

Tehnica de lucru

Se execută câte un frotiu din culturile bacteriene folosite pentru tehnica Neisser, precum și un frotiu din infuzia de fân. După uscare se fixează la flacăra. În continuare, frotiurile se tratează cu colorantul Albert. Durata tratamentului (colorării) este de 5 minute. Adesea se execută și o ușoară încălzire (fără a duce la fierbere). Apoi colorantul se varsă și fără spălare se adaugă soluție Lugol. Aceasta se ține pe lamă 1 minut. Soluția Lugol se varsă, lama se spală cu apă de robinet, se usucă și se examinează la microscop (ob.90x). Volutina apare sub forma unor corpi sferici colorați în albastru intens, în citoplasma colorată într-un verde pal.

10.3. Evidențierea peretelui celular bacterian

Celula bacteriană este delimitată de un perete celular bine definit structural și cu consistență rigidă. Datorită rigidității sale, peretele reprezintă scheletul celulei, fiind răspunzător de forma caracteristică a bacteriilor. Situat deasupra membranei citoplasmatică, el este acoperit, la unele specii, de o capsulă sau de un strat mucos pericelular, iar la bacteriile mobile (motile) este străbătut de cili (flageli) și la cele piliate de pili.

Datorită indicelui său de refracție mic, peretele celular este invizibil ori foarte greu vizibil (de ex. la *Beggiatoa mirabilis*) la celule vii examinate la microscopul fonic.

Evidențierea lui este posibilă prin colorare selectivă sau prin examinare la microscopul electronic. La bacteriile tinere, peretele celular aderă intim la conținutul celular subiacent. La celulele bătrâne, la cele în curs de liză sau la cele plasmolizate, peretele celular devine evident, fiind depărtat de citoplasmă.

10.3.1. Metoda lui Bisset și Hale

Material necesar.

1. Culturi bacteriene tinere

2. Soluție de acid fosfomolibdenic 1%
3. Soluție apoasă de verde de metil 1%.

Tehnica de lucru

Pe o lamă de microscopie bine degresată și curată se execută un frotiu bacterian. Frotiul încă puțin umed și nefixat se acoperă cu soluția de acid fosfomolibdenic. Acidul se ține pe lamă timp de 4 minute, după care se varsă. Fără spălare se adaugă soluția de verde de metil și se ține pe lamă 5 minute. Apoi lama se spală cu apă de robinet, se usucă și se examinează la microscop, folosind obiectivul cu imersie. Peretele celular apare colorat într-un verde închis sau albastru, iar citoplasma rămâne incoloră sau se colorează într-un verde slab.

10.3.2. Metoda Gutstein

Material necesar:

1. Fixator Carnoy. Acesta se compune din:

Alcool etilic 95°	6 părți
Cloroform	3 părți
Acid acetic glacial	1 parte

2. Tanin, soluție 5-10%
3. Cristal violet, soluție apoasă 0,02%
4. Acetonă.

Tehnica de lucru

Se execută un frotiu dintr-o cultură bacteriană tânără. Frotiul uscat se fixează cu fixatorul Carnoy timp de 5-10 minute. Apoi se spală cu apă de robinet.

În continuare, se tratează cu o soluție apoasă de tanin 5-10 %, timp de 20-30 de minute. Se spală cu apă de robinet timp de 60 de secunde. Se colorează cu o soluție apoasă de cristal violet, timp de 30 de secunde. Colorantul se varsă și frotiul se spală cu acetonă (o dată sau de două ori). Preparatul se usucă și se examinează cu obiectivul 90x. Peretele celular se colorează în violet, iar citoplasma nu se colorează sau se colorează foarte slab.

10.4. Evidențierea capsulei bacteriene

Unele bacterii prezintă în jurul lor un înveliș mai mult sau mai puțin voluminos, format dintr-o masă gelatinoasă, hialină, a cărei formare este în funcție de specie și de condițiile de mediu. Acest înveliș net delimitat se numește capsulă. Datorită indicelui său de refracție foarte apropiat de acela al mediului, capsula este greu de

observat prin microscopia directă. Având o afinitate slabă pentru coloranți, ea poate fi evidențiată numai prin colorații speciale cu mordansare sau apare ca o imagine negativă după colorarea cu tuș de China (se colorează celula bacteriană și fondul preparatului, în timp ce capsula rămâne ca un halou pericelular incolor și refringent). După colorațiile uzuale, capsula rămâne, de asemenea, ca un halou incolor.

Prezența capsulei dă culturilor pe medii lichide un caracter vâscos, siropos, iar pe mediile solide coloniile au un aspect umed, lucios, mucoid și dovedesc o consistență mucoasă atunci când sunt ridicate cu ansa. Capsula poate fi pusă în evidență prin diferite metode speciale de colorare.

10.4.1. Metoda de colorare negativă cu tuș de China (metoda Burri)

Material necesar

- Tuș de china
- Soluția de albastru de metilen Löffler

Tehnica de lucru

Pe o lamă de microscopie se pune o picătură de ser fiziologic în care se face o suspensie din germenii de examinat. Alături se pune o picătură de tuș. După ce s-a obținut suspensia dorită, aceasta se amestecă cu tușul și se omogenizează bine. Din acest amestec se execută frotiurile (tehnica este asemănătoare cu cea care se aplică la executarea frotiurilor din sânge). În acest scop marginea unei lame șlefuite se aplică pe lama cu suspensia așa încât cele două lame să facă între ele un unghi de 30-45°. La marginea de contact dintre cele două lame picătura cu suspensia bacteriană se întinde prin capilaritate. Cu o mișcare uniformă de translație se împinge lama șlefuită spre stânga, până ce întreaga picătură de suspensie este epuizată. Mișcarea va fi ușoară și rapidă. Întinderea frotiului nu trebuie întreruptă iar lama nu trebuie ridicată decât atunci când picătura de suspensie s-a epuizat (fig.23). Frotiurile se colorează timp de 1-2 minute cu soluție de albastru de metilen Löffler. Se varsă apoi colorantul, iar lama se spală cu apă de robinet. După uscare se examinează la microscop (obiectivul 90x). La examenul microscopic se observă un fond negru pe care bacteriile apar colorate în albastru. Între fondul negru și celulele bacteriene se observă o zonă clară, necolorată, care corespunde spațiului ocupat de capsulă. Aceasta reprezintă o metodă indirectă de

punere în evidență a capsulei, deoarece capsula nu se colorează, ci se deduce existența ei prin prezența unui spațiu clar.

10.4.2. Metoda Muir

Material necesar:

- Mordant Muir, care are următoarea compoziție:
- Acid tanic, soluție apoasă 2 părți
- Sublimat corosiv (HgCl_2), soluție saturată 2 părți
- Alaun de potasiu, soluție saturată 5 părți
- Fucsină Ziehl
- Alcool etilic 96°
- Albastru de metilen 1 %

Tehnica de lucru

Frotiul uscat și fixat la flacăra se colorează la cald cu fucsină Ziehl, timp de 2 minute (se va proceda ca și în cazul colorației Ziehl-Neelsen, făcând să se emită de două ori vaporii). Se spală rapid cu alcool etilic 95° și apoi cu apă. În continuare, frotiul se acoperă cu mordant Muir, care se ține pe lamă timp de 60 de secunde. Mordantul se varsă și lama se spală cu apă. Frotiul se recolorează apoi cu albastru

Fig.23. Timpii de executare a frotiului pentru metoda Burri

de metilen 1%. Durata recolorării: 1 minut. Lama se spală cu apă, se usucă și se examinează la microscop (obiectiv 90x). Bacteriile se colorează în roșu, iar capsula în albastru.

10.4.3. Metoda Giemsa

Material necesar: soluție Giemsa.

Tehnica de lucru

Frotiurile uscate, dar nefixate, se acoperă cu soluție Giemsa în strat subțire, numărând picăturile depuse pe lamă. După 60 de secunde se adaugă picătură cu picătură apă distilată sau bidistilată în proporție egală sau de două ori în raport cu volumul de colorant inițial. Înclinând

lama într-o parte și alta se amestecă cât mai bine soluția Giemsa cu apă distilată sau bidistilată. După amestecare, se lasă pe lamă 5 minute. Apoi soluția de colorant se varsă, lama se spală cu apă de robinet. După uscare se examinează la microscop. Capsula se colorează în diferite nuanțe de violet-roz, iar corpii bacterieni într-un violet mai închis.

10.4.4. Metoda lui Anthony și Tyler

Material necesar: -

Soluția A, care se compune din:

- | | |
|-----------------------|---------|
| - Cristal violet | 0,1 g |
| - Acid acetic glacial | 0,25 ml |
| - Apă distilată | 100 ml. |

Soluția B: este o soluție de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20%.

Tehnica de lucru:

Frotiul uscat la aer, dar nefixat se introduce în soluția A și se ține timp de 4-7 minute. Apoi se scoate și se spală cu soluția B. După uscare, se examinează la microscop. Capsula apare colorată în albastru-violet, iar corpii bacterieni în albastru închis.

10.5. Evidențierea cililor bacterieni

Cilii sau flagelii sunt formațiuni filamentoase lungi și subțiri, flexibile și fragile care constituie organe de locomotie. Prezintă cili marea majoritate a spirililor și a vibriunilor și aproximativ jumătate din bacteriile cu formă de bastonaș. Cilii se întâlnesc numai excepțional la coci.

10.5.1. Evidențierea cililor prin metode indirecte

Evidențierea mobilității se poate efectua prin mai multe metode.

10.5.1.1. Examenul între lamă și lamelă

Pe o lamă de microscop se pune într-o picătură de ser fiziologic o cantitate mică din colonia germenului de studiat și se face o suspensie ușor opalescentă. Se acoperă suspensia cu o lamelă și se examinează la microscop (ob. 40x).

10.5.1.2. Examenul în picătură suspendată

Pe o lamelă se depune o picătură de ser fiziologic în care se suspendă germenii de examinat. Lamela se răstoarnă printr-o mișcare rapidă, în așa fel ca picătura să nu se prelingă și se depune pe o lamă excavată. Se examinează imediat la microscop, ob. 40x.

La examinarea motilității bacteriilor trebuie respectate următoarele condiții:

- culturile germenilor examinați trebuie să fie tinere (18-20 de ore), la culturile vechi mobilitatea este mai scăzută;
- la bacteriile care se dezvoltă la fel de bine atât în mediu lichid cât și pe mediu solid, este bine ca materialul necesar pentru executarea suspensiei să fie recoltat din cultura pe mediu solid; aceasta permite obținerea unei suspensii mai dense pe de o parte, iar pe de altă parte mobilitatea bacteriilor pe medii solide este mai accentuată decât în mediile lichide;
- la executarea suspensiei trebuie avut grijă ca ansa să fie bine răcită (după sterilizarea la roșu), pentru a nu omorî germeii prin căldură;
- examenul microscopic trebuie făcut cât mai rapid după executarea suspensiei pentru a nu se usca;
- manipularea lamei se face în așa fel ca să se asigure preparatului în permanență o poziție orizontală;
- examenul microscopic se face fie cu obiectivul cu imersie, fie cu ob. 40x, la o luminozitate mai scăzută a câmpului microscopic (condensorul trebuie coborât).

La examenul motilității se pot distinge următoarele mișcări:

1. mișcări browniene (mișcări pe loc cu un aspect tremurat);
2. mișcări ale curenților de lichid;
3. mișcări ale germenilor datorate cililor (celulele traversează câmpul microscopic).

Pentru precizia rezultatelor trebuie făcută o diferențiere a acestor tipuri de mișcări.

10.5.1.3. Metoda tubului în U sau metoda transmigației

Într-un tub de sticlă în formă de U se toarnă un mediu nutritiv slab solidificat (bulion peptonat cu agar 0.3%). Mediul nutritiv trebuie să ajungă în ambele ramuri ale tubului la $\frac{1}{2}$ din înălțimea acestora. Ambele ramuri se închid cu dopuri de vată și apoi se sterilizează în autoclav

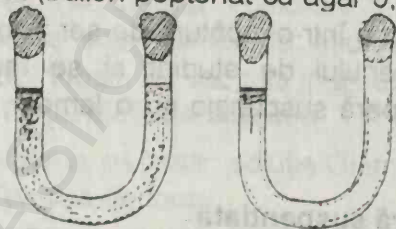


Fig.24. Examenul motilității prin folosirea tuburilor în formă de U

A: bacterie mobilă; B: bacterie imobilă

B. (120°C/30 de minute). După solidificarea mediului, într-una din ramuri se însămânțează, în condiții sterile, tulpina bacteriană de examinat. Tuburile însămânțate se pun la incubat (37°C),

bacteriană de examinat. Tuburile însămânțate se pun la incubat (37°C),

urmărindu-se din când în când. Speciile bacteriene *imobile* (nemotile) se dezvoltă numai în ramura în care s-a făcut însămânțarea și numai de-a lungul liniei de însămânțare, pe când speciile bacteriene *mobile* (motile) difuzează în toată masa mediului, producând o turbiditate uniformă a acestuia, invadând până la suprafața mediului din ramura opusă (fig.24). Această din urmă metodă indirectă este cel mai frecvent utilizată, dând rezultate bune și în cazul speciilor cu o mobilitate slabă.

10.5.2. Evidențierea cililor prin metode directe (de colorare)

Cilii fiind foarte subțiri și având o afinitate scăzută pentru diverși coloranți nu sunt vizibili nici în preparatele colorate în mod obișnuit. Pentru evidențierea lor cilii se mordansează: mordantul se depune pe suprafața cililor și în acest fel le mărește diametrul și afinitatea.

Pregătirea preparatelor. Se va lucra cu lame de microscopie foarte curate, care au fost ținute în prealabil 7 zile în amestec oxidant sulfocromic. Culturile examinate trebuie să fie tinere (18-20 de ore), crescute de preferință pe medii cu geloză simplă în tuburi înclinate. Suspensia bacteriană se prepară cu foarte mare grijă, recoltând din lichidul de condensare de la capătul tubului o cantitate mică de cultură care se introduce în 1-3 ml de apă distilată sterilizată. Suspensia astfel pregătită, în tuburi mici, se lasă circa 30 minute la temperatura camerei. Se depune apoi o picătură recoltată cu mare grijă pe unul din capetele lamei în prealabil flambată și răcită. Se înclină încet lama și cu grijă până ce picătura traversează lungimea lamei. Se usucă apoi la aer.

10.5.2.1. Metoda Bailey modificată de Fischer și Conn.

Material necesar:

Soluția A: Mordant fier-tanin

Tanin (soluție apoasă 10%)

18 ml

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (soluție apoasă 6%)

6 ml

Soluția B: Substanța colorantă-mordant

Soluția A

3,5 ml

Fucsină bazică (soluție alcoolică 0,5%)

0,5 ml

HCl concentrat

0,5 ml

Formalină

2,0 ml

Soluția C: Soluție de fucsină Ziehl.

Tehnica de lucru:

Se execută preparatul conform celor arătate mai înainte. Se filtrează soluția A pe lamă și se lasă timp de 3-5 minute, fără încălzire. Se înlătură soluția A. *Frotiul nu se spală cu apă.* Se adaugă soluția B, de asemenea filtrată direct pe lamă. Aceasta se ține pe lamă timp de 7

minute, fără să fie încălzită. În continuare preparatul se spală cu apă distilată. Înainte de uscare frotiul se acoperă cu fucsină și se ține 1 minut, timp în care se execută o ușoară încălzire (până la prima emisie de vapori). Preparatul se spală apoi cu apă de robinet, se usucă la aer și se examinează la microscop (ob. 90x). Celulele și cilii se colorează în roșu.

10.5.2.2. Metoda lui Plimer și Paine

Material necesar:

Acid tanic	10 g
Clorură de aluminiu	18 g
Clorură de zinc	10 g
Rosanilină hidroclorică	1,5 g
Alcool etilic 60%	40 ml

Substanțele solide se mojarază cu puțin alcool până când se formează o pastă omogenă. Apoi este adăugat restul de alcool. Această soluție se păstrează timp de mai mulți ani.

Tehnica de lucru

Se execută un frotiu conform celor arătate mai înainte. Colorantul de mai sus se diluează înainte de folosire în proporție de 1:4 cu apă distilată. Se așteaptă un minut până când va apărea un precipitat. Se filtrează pe lamă și se lasă timp de 2 minute. Apoi se spală cu apă distilată. Se colorează apoi câteva secunde cu albastru de metilen care colorează corpul microorganismelor. Se spală cu apă de robinet, se usucă și se examinează la microscop. Cilii vor fi colorați în roșu.

10.5.2.3. Metoda Leifson

Material necesar:

NaCl soluție 1,5%	20 ml
Tanin soluție 3%	20 ml
Fucsină bazică soluție alcoolică 1,2%	20 ml

Soluția de colorant trebuie să fie proaspătă și se întrebuițează proaspăt filtrată pe lamă. Timpul de colorare este 20-30 de minute. Se spală, se usucă și se examinează la microscop (ob. 90 x). Celulele și cilii se colorează în roșu.

10.5.2.4. Metoda Blenden-Goldberg

Material necesar:

Soluția A:	Tanin	5 g
	FeCl ₃	1,5 g
	Formalină soluție 15%	2 ml
	NaOH soluție 1%	1 ml
	H ₂ O distilată	100 ml

Se amestecă și se dizolvă , apoi se filtrează.

Soluția B: AgNO_3 2%

Amoniac soluție 25-30%

90 ml dintr-o soluție de azotat de argint 2% se amestecă picătură cu picătură cu amoniac 25-30 % până când sedimentul (precipitatul) apărut se dizolvă din nou. Apoi se adaugă picătură cu picătură soluție de AgNO_3 până când apare o turbureală slabă.

Tehnica de lucru

Se execută un preparat conform instrucțiunilor de la început. Se tratează cu soluția A. timp de 2-4 minute. Apoi se spală cu apă distilată. Se acoperă cu soluția B timp de 1 minut. Se spală cu apă de robinet și se usucă la aer. Se examinează la microscop (ob. 90x). Corpii bacterieni și cilii apar într-un negru-brun pe fondul închis.

10.6. Evidențierea sporului bacterian

Sporul este o formațiune endocelulară, refringentă și foarte rezistentă la factorii nocivi ai mediului. Sporul este capabil să păstreze un timp îndelungat, în stare latentă, toate caracterele genotipice ale celei vegetative din care s-a format. Sporogeneza reprezintă un caracter de specie cu valoare taxonomică importantă. Sporii se întâlnesc cu regularitate la genurile *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* și *Desulfotomaculum*.

10.6.1. Punerea în evidență a sporului bacterian prin metoda indirectă (fiziologică)

La un examen microscopic prezența sporului poate trece neobservată, atunci când în culturi numărul sporilor este mic. În asemenea cazuri sporul poate fi pus în evidență pe baza proprietăților sale de a rezista la temperaturi mai înalte în raport cu temperaturile în care sunt distruse celulele vegetative.

Tehnica de lucru

Materialul din care urmează să se pună în evidență prezența sporilor se supune unei încălziri timp de 15 minute, pe baie de apă, la 65-70°C. După încălzire, din acest material se execută însămânțări pe medii nutritive (lichide sau solide). Mediile însămânțate se pun la termostat și se examinează după 24-48 de ore. Dacă în materialul cercetat au existat spori, aceștia germinează în mediile de cultură, iar după germinare prin multiplicarea celulelor vegetative se obțin culturi bine dezvoltate.

10.6.2. Metode directe (de colorare=morfologice)

Datorită slabei permeabilități a învelișului sporal, densității mari a sporoplasmei și a unei slabe afinități pentru coloranți, sporii nu se colorează prin metode uzuale sau se distinge numai conturul lor. Ei rămân incolori și refringenti în contrast cu restul celulei vegetative care se colorează. Sporul poate fi colorat – apărând ca un coc oval sau sferic omogen – cu ajutorul soluțiilor concentrate de coloranți bazici, după permeabilizarea la cald a învelișului sporal.

10.6.2.1. Metoda Scheffer-Fulton

Material necesar:

Verde de malachit soluție apoasă 5%

Safranină soluție apoasă 0,5% sau fucsină Pfeiffer.

Tehnica de lucru

Se execută un frotiu dintr-o cultură de *Bacillus subtilis*. Frotiul uscat se fixează la flacără. Colorarea se face în două etape.

a. *Colorarea cu verde de malachit*. Frotiul se acoperă cu verde de malachit. Colorarea se face la cald și durează 5 minute. Încălzirea se face în așa fel ca în acest interval să se emită de 3-4 ori vapori. După răcire, preparatul se spală cu apă de robinet.

b. *Colorarea cu fucsină Pfeiffer sau safranină*. Lama se acoperă cu fucsină Pfeiffer sau safranină și se ține 1 minut. Colorarea se face la rece. Urmează spălarea lamei cu apă de robinet, uscarea și examinarea la microscop, cu obiectivul 90x.

Sporii apar colorați în verde, iar celulele vegetative în roșu.

10.6.2.2. Metoda Möller

Material necesar:

- Acid cronic 5%
- Fucsină Ziehl
- Acid sulfuric 5%
- Albastru de metilen soluție apoasă (1:10000), care se prepară din două soluții:

A.	Albastru de metilen	0,02 g
	Apă distilată	100 ml
B.	Soluție tampon fosfat:	
	- KH_2PO_4 soluție M/5	99,75 ml
	- Na_2HPO_4 soluție M/5	0,25 ml

Cele două soluții se amestecă în proporții egale 1:1.

Tehnica de lucru

Frotiul fixat la flacără se introduce pentru 1-2 minute într-un pahar cu acid cromic 5%. Apoi se spală cu apă de robinet. Se acoperă cu fucsină Ziehl și se încălzește în așa fel ca în decurs de 5 minute să se emită de 3 ori vapori. După răcire se spală cu apă și se introduce într-un vas unde se găsește acid sulfuric 5%. Aici preparatele se țin câteva secunde și apoi se spală imediat cu apă de robinet. Urmează colorarea cu albastru de metilen care durează 2-6 minute. Preparatele se spală cu apă, se usucă și se examinează la microscop, cu obiectivul 90x. Sporii apar colorați în roșu, iar celulele vegetative în albastru.

10.7. Evidențierea incluziunilor polizaharidice

Incluziile polizaharidice (glicogen, amidon) se colorează în mod selectiv cu iod, în brun închis sau albastru.

Evidențierea glicogenului pe preparate între lamă și lamelă.

Principiul metodei. Incluziile de glicogen se evidențiază prin colorare specifică cu o soluție de JJK..

Material necesar

- Soluție de JJK (Lugol) alcătuită din iod metalic 1 g, KI 2 g, apă distilată 60 ml
- lame de microscopie
- tăvi de colorare
- lamele
- pipete Pasteur sterile
- culturi microbiene (*Saccharomyces cerevisiae*) crescute pe mediu malt-agarizat. Se efectuează suspensii de *S. cerevisiae* în soluție de zaharoză 10% (sterilizată prin tindalizare), care se păstrează 24 ore la temperatura camerei, pentru a stimula acumularea de glicogen.

Tehnica de lucru

Se efectuează un preparat microscopic prin adăugarea unei picături de cultură microbiană pe o lamă de microscopie degresată, cu o pipetă Pasteur. Se adaugă apoi o picătură de soluție Lugol cu o pipetă Pasteur și se amestecă bine cu prima picătură. Se acoperă cu lamela (evitându-se apariția bulelor de aer). Preparatul se examinează la microscop cu ob. 40x. Incluziile de glicogen vor apărea colorate în brun închis, în contrast cu citoplasma colorată în galben.

10.8. Evidențierea incluziilor lipidice

Principiul metodei. Incluziile de PHB (poli- β -hidroxibutirat) se evidențiază prin colorare selectivă cu Negru de Sudan (colorant liposolubil).

Material necesar:

- Negru de Sudan, soluție alcoolică 0,3 %
- Safranină, soluție apoasă 0,5%
- Xilen
- Lame de microscopie
- Tăvi de colorare
- Anse de însămânțare
- Pipete Pasteur sterile
- Culturi bacteriene (*Bacillus sp.*, *Azotobacter chroococcum*) de 48-72 ore

Tehnica de lucru

Se execută frotiuri din bacteriile studiate, care se usucă la aer și se fixează la flacără (o fixare ușoară). Se colorează cu soluție alcoolică de Negru de Sudan 0,3%, timp de 15 minute, la rece. Se spală cu xilen. Se îndepărtează urmele de xilen cu hârtie de filtru. Se acoperă apoi lama cu soluție de safranină 0,5% și se ține 30 de secunde. Preparatele se spală cu apă, se usucă și se examinează la microscop cu ob. 90x. Incluziile lipidice apar colorate în negru, în contrast cu citoplasma roz. La *Azotobacter chroococcum* incluziile de PHB sunt localizate în centrul celulei, fiind relativ mari, pe când la *Bacillus sp.* (de exemplu *B.megaterium*) sunt mai mici, numeroase, dar fără o anumită localizare în interiorul celulei.

11. EXAMINAREA CARACTERELOR BIOCHIMICE

Caracterele biochimice constituie un grup important de indici utilizați în scopul identificării bacteriilor. Ele constau în evidențierea echipamentului enzimatic al bacteriilor. Acesta diferă de la o specie la alta prin așa numitele "reacții" sau "teste biochimice". Pentru multe enzime bacteriene s-au pus la punct teste biochimice specifice. În vederea executării testelor biochimice se folosesc medii speciale, numite și medii de diagnostic, care conțin un substrat fermentescibil.

Punerea în evidență a enzimelor bacteriene prin teste biochimice se realizează prin două categorii de metode mai importante.

A. Metode prin care se urmărește în mod direct acțiunea bacteriei asupra unui substrat. În acest caz se observă însăși modificarea fizică sau chimică a substratului (de ex. lichefierea gelatinei, lichefierea serului coagulat etc.).

B. Metode prin care nu poate fi observată în mod direct modificarea substratului, dar prin care se pun în evidență cu ajutorul diferiților reactivi, metabolii rezultați din scindarea substratului în urma acțiunii enzimelor bacteriene (de ex. triptofanaza nu se pune în evidență printr-o modificare vizibilă a triptofanului din mediu, ci prin punerea în evidență a indolului, metabolit rezultat din descompunerea triptofanului).

11.1. Evidențierea proprietăților bacteriilor de a degrada glucide

Marea majoritate a speciilor bacteriene posedă proprietatea de a descompune glucidele rezultând acizi, gaze, aldehide, alcoolii. Pentru a fi puse în evidență aceste proprietăți zaharolitice, bacteriile se cultivă pe medii lichide sau solide, la care se adaugă glucidele (zaharurile) respective și un indicator al reacției mediului. Cel mai frecvent se folosesc mediile lichide, așa cum este de ex. apa peptonată la care se adaugă glucidul respectiv sub formă de soluție 0,5-1% și un indicator de pH, sau mediul nutritiv Hiss cu indicatorul Andrade.

Dintre glucide cel mai mult se utilizează următoarele:

- monozaharide (glucoză, fructoză, manoză, galactoză, arabinoză, xiloză, ramnoză);
- dizaharide (zaharoză, maltoză, lactoză);
- trizaharide (rafinoză);
- polizaharide (amidon, inulină, glicogen);
- glicozide (salicină, esculină);
- alcoolii polihidroxilici (manitol, dulcitol, sorbitol, inozitol).

11.1.1. Examinarea proprietăților de a degrada zaharurile în apa peptonată cu albastru de bromtimol

Material necesar:

- Apă peptonată, repartizată în eprubete (9 ml/eprubetă)
- Soluții de glucide sterile (glucoză 10%, zaharoză 10%), sterilizarea efectuându-se prin tindalizare (câte o oră la 100°C, 3 zile consecutiv) sau în autoclav la 105°C, 20 de minute.
- Indicator de pH: albastru de bromtimol
- Culturi bacteriene de testat (*E. coli* și *Bac. subtilis*).

Tehnica de lucru

În eprubetele cu apă peptonată se adaugă cu o pipetă gradată sterilă, în condiții de sterilitate, 1 ml de glucoză 10%, respectiv 1 ml de zaharoză 10%. Concentrația finală a acestor două zaharuri va fi de 1%. Se însămânțează cu bacteriile testate atât mediul cu glucoză, cât și cel cu zaharoză. Câte o eprubetă cu apă peptonată+ glucoză, respectiv cu apă peptonată+zaharoză rămân neînsămânțate, reprezentând proba martor. Atât eprubetele însămânțate cât și cele martor se pun la incubat la 28°C, respectiv la 37°C, timp de 24-48 de ore. După incubare în fiecare eprubetă se adaugă 0,5 ml indicator (albastru de bromtimol). Dispariția colorației albastre demonstrează metabolizarea zaharurilor adăugate cu formare de acizi (pH-ul devine acid).

Subliniem faptul că atunci când reacția se urmărește mai mult timp este indicat ca albastrul de bromtimol să se adauge la apa peptonată înainte de sterilizarea mediului.

Unele bacterii fermentează zaharurile cu producere de gaz. Acest caracter se pune în evidență tot pe mediul lichid, în care se introduc tubușoare Durham.

11.1.2. Testul de hidroliză a amidonului

Material necesar:

- Mediul nutritiv: geloză simplă care conține amidon solubil în proporție de 0,2%
- Soluție Lugol (identică cu cea folosită pentru evidențierea glicogenului: 7 g iod+20 g KJ se dizolvă în 100 ml apă distilată) sau soluție saturată de iod (20 g iod+100 ml alcool etilic de 50°)
- Culturi bacteriene de testat
- Cutii Petri sterile.

Tehnica de lucru

Se lichefiază mediul pe baia de apă și se răcește apoi la circa 60°C. Se toarnă în cutiile Petri. După solidificare se însămânțează cu bacteria de studiat. Incubarea se face la 28°C sau 37°C, timp de 48 de ore. După dezvoltarea culturilor, suprafața mediului se acoperă cu soluție Lugol sau soluție saturată de iod. Mediul se colorează în albastru violaceu datorită prezenței amidonului, cu excepția zonelor de mediu din jurul coloniilor bacteriene care au hidrolizat amidonul și care rămân necolorate. În aceste zone s-a produs hidroliza amidonului sub acțiunea amilazelor bacteriene excretate în mediu.

11.1.3. Testul de hidroliză a esculinei

Se folosește pentru diferențierea streptococilor.

Material necesar:

- Apă peptonată sau apă peptonată agarizată
- Esculină
- Citrat feric
- Diferite tulpini de streptococi.

Tehnica de lucru

La 100 ml apă peptonată sau apă agarizată se adaugă 0,1 g esculină și 0,05 g citrat feric. Mediul se repartizează în eprubete (10 ml/eprubetă) și se sterilizează la 115°C, timp de 20 de minute. Se însămânțează apoi cu tulpinile de studiat. După 2-7 zile de incubare la 37°C se observă o înnegrire a mediului în cazul când s-a produs hidroliza esculinei,

- Dihidroxycumarina eliberată din esculină reacționează cu citratul feric rezultând un compus de culoare neagră.

11.2. Evidențierea proprietăților proteolitice ale bacteriilor

Bacteriile prezintă proprietatea de a descompune substanțele proteice, fapt ce se poate pune în evidență prin mai multe teste.

11.2.1. Testul de gelatinoliză

Material necesar:

- Mediu cu gelatină
- Culturi de studiat.

Tehnica de lucru

Se prepară mediul cu gelatină (vezi pag. 27) și se repartizează în eprubete (10 ml/eprubetă). Apoi se lasă să se răcească în poziție verticală. În continuare mediul se însămânțează prin înțepare cu

bacteriile de studiat, introducând acul drept în centrul coloanei, astfel ca să ajungă până la fundul eprubetei. Culturile se așează în poziție verticală la 20-22°C. Durata incubării este de 12 zile. În acest interval se urmărește creșterea bacteriei testate și gradul de lichefiere a gelatinei la

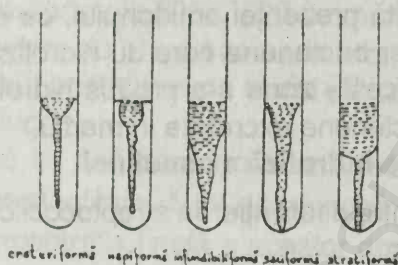


Fig.25. Forma lichefierii mediului cu gelatină, însămânțat prin înțepare

diferite intervale de timp. Astfel, poate avea loc creșterea fără lichefiere sau creșterea cu lichefiere, deosebindu-se diferite aspecte (fig. 25). Citirea rezultatelor se face, în general, de 3 ori: după o zi, după 10 și respectiv după 12 zile.

Dacă bacteria testată nu se dezvoltă la 20°C, atunci se poate cultiva în gelatină la 37°C. În acest caz pentru citirea rezultatelor eprubeta cu mediul însămânțat cu bacteria test, după incubare se introduce în frigider pentru 30-60 minute și apoi se notează gradul de lichefiere, comparativ cu mediul martor neînsămânțat.

11.2.2. Testul de hidroliză a cazeinei

Material necesar:

- Mediul nutritiv: geloză simplă
- Lapte smântânit steril
- Cutii Petri sterile
- Bacteriile de studiat.

Tehnica de lucru

Pentru a pune în evidență proprietatea de hidroliză a cazeinei se folosește mediul geloză-lapte. La geloză simplă repartizată în eprubete (20 ml/eprubetă), sterilizată și lichefiată se adaugă lapte steril smântânit (2 ml/eprubetă). Amestecul se repartizează într-o cutie Petri. Germenii

de studiat se însămânțează în suprafață. Dacă aceștia au proprietăți proteolitice, cazeina din lapte se peptonizează sub acțiunea cazeinazei și în jurul coloniilor mediul se clarifică (inițial mediul are un aspect alb mat).

11.2.3. Testul de lichefiere a serului coagulat

Material necesar:

- Ser de bou sau de iepure
- Bacteriile de studiat.

Tehnica de lucru

Serul recoltat în condițiile aseptice se repartizează în eprubete sterile (6 ml/eprubetă). În continuare, eprubetele se pun în poziție înclinată în coagulator, pentru coagulare la 70-75°C. În urma coagulării mediul devine alb-cunușiu.

Bacteriile de studiat se însămânțează pe suprafața mediului. După incubare se urmărește lichefierea și formarea depresiunilor pe suprafața mediului, în dreptul coloniilor.

11.2.4. Testul de hemoliză

Material necesar:

- Geloză simplă
- Sânge de ovine, recoltat pe citrat de Na
- Cutii Petri sterile, pipete gradate sterile
- Bacteriile de studiat.

Tehnica de lucru

Eprubetele cu mediu (20 ml/eprubetă) se lichefiază pe baia de apă. Se răcește apoi la 45-50°C și se adaugă 2 ml sânge (recoltat pe citrat de sodiu; 0,2 ml citrat steril soluție 5% în 0,8 ml sânge). După o ușoară omogenizare se toarnă amestecul într-o cutie Petri. Sterilizarea soluției de citrat de sodiu se face în autoclav la 120°C, 20 de minute. După solidificarea mediului, acestea se însămânțează în suprafață cu bacteriile de testat (tulpini de *Staphylococcus* și *Streptococcus*). Incubarea se face la 37°C, timp de 24-48 ore.

În urma creșterii pe medii cu sânge, bacteriile pot produce următoarele aspecte:

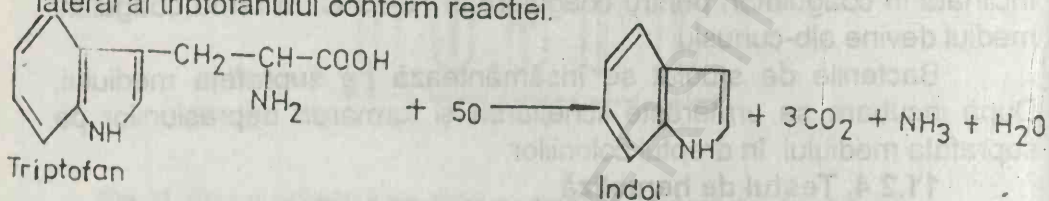
1. dezvoltarea fără schimbarea aspectului mediului (bacterii nehemolitice = hemoliză gama);
2. dezvoltarea însoțită de decolorarea și clarifierea mediului în dreptul și la diferite distanțe în jurul coloniilor; această modificare corespunde unui proces de hemoliză și hemodigestie (hemoliză beta); mărimea zonei de hemoliză din jurul coloniilor este în funcție de cantitatea de hemolizine secretate de bacterii și de gradul lor de activitate;

3. dezvoltarea însoțită de colorarea în verde a mediului în dreptul și în jurul coloniilor; această modificare corespunde transformării hemoglobinei în methemoglobină sub acțiunea H_2O_2 produsă de bacterii (efect viridans sau hemoliză alfa).

11.3. Evidențierea produsilor rezultați din descompunerea aminoacizilor

11.3.1. Punerea în evidență a indolului

Unele bacterii cultivate în bulion sau apă peptonată au proprietatea de a descompune triptofanul. Triptofanaza oxidează lanțul lateral al triptofanului conform reacției.



Material necesar:

- Mediu nutritiv: apă peptonată
- Reactivul Kovács, care se prepară astfel: se dizolvă 5 g *p*-dimetilaminobenzaldehidă în 75 ml alcool amilic sau alcool *n*-butilic, după care se adaugă cu grijă 25 ml acid clorhidric concentrat.

- Bacteriile de studiat.

Tehnica de lucru

Apa peptonată se repartizează în eprubete (10 ml/eprubetă). Se sterilizează la $120^\circ C$, 20 de minute. Apoi eprubetele se însămânțează cu bacteria testată. Incubarea durează 3 zile la $28^\circ C$ sau $37^\circ C$. După incubare pentru evidențierea indolului din mediu se utilizează reactivul Kovács. Astfel în fiecare eprubetă se adaugă 3-5 picături din acest reactiv. Eprubetele se agită foarte ușor și apoi se lasă să stea în repaos 5 minute. Dacă indolul este prezent în mediu, la suprafața mediului apare un inel de culoare roșie-vișinie.

11.3.2. Evidențierea producerii de H_2S

Hidrogenul sulfurat este un produs rezultat din descompunerea aminoacizilor care conțin sulf (cisteina, cistina, metionina) sub acțiunea enzimelor bacteriene.

Producerea de H_2S se evidențiază prin mai multe metode.

11.3.2.1. Metoda cultivării pe mediu cu acetat de plumb

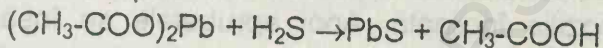
Material necesar:

- Mediu nutritiv: geloză simplă

- Acetat de Pb
- Cutii Petri sterile
- Bacterii de testat.

Tehnica de lucru

La mediul nutritiv (geloză simplă) se adaugă acetat de Pb în proporție de 1%. Mediul nutritiv se repartizează în eprubete (7 ml/eprubetă) și se sterilizează apoi la 120°C, 20 de minute. Eprubetele se lasă să se solidifice în poziție înclinată. Mediul se poate repartiza și în cutii Petri (20 ml/cutie). În continuare se însămânțează în suprafață bacteriile de studiat. Incubarea se face la 28°C sau 37°C, timp de 48 de ore. Dacă bacteria produce H₂S atunci mediul se înnegrește în jurul coloniei, datorită PbS care rezultă din combinarea H₂S cu (CH₃-COO)₂Pb conform reacției:



11.3.2.2. Metoda benzilor cu acetat de plumb

Material necesar:

- Mediu nutritiv: bulion propriu-zis
- Benzi de hârtie de filtru (6/1 cm) îmbibate cu soluția de acetat de Pb 10%; se usucă și se introduc în eprubete, după care se sterilizează în autoclav la 120°C, timp de 20 de minute.
- Bacteriile de studiat.

Tehnica de lucru

Mediul nutritiv se repartizează în eprubete (10 ml/eprubetă). Se sterilizează în autoclav, 20 de minute la 115°C. După răcire se însămânțează cu bacteria test. În continuare, în fiecare eprubetă însămânțată se introduce, în condiții aseptice, câte o bandă de hârtie fixându-se cu dopul de vată la aproximativ 1 cm de la suprafața mediului. Dacă bacteria produce H₂S, banda de hârtie se înnegrește în porțiunea inferioară după 24 de ore sau mai multe zile de incubare la 28°C sau 37°C.

11.3.2.3. Evidențierea producerii H₂S pe mediul trizaharat cu fier (Triple sugar iron agar)

Material necesar:

- Mediul nutritiv: mediul trizaharat cu fier

Acesta are următoarea compoziție:

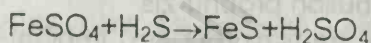
- | | |
|----------------------|------|
| - Extract de carne | 3 g |
| - Extract de drojdie | 3 g |
| - Peptonă | 15 g |
| - Proteoză-peptonă | 5 g |

- Lactoză	10 g
- Zaharoză	10 g
- Glucoză	1 g
- FeSO ₄	0,2 g
- NaCl	5 g
- Na ₂ S ₂ O ₃	0,3 g
- Roșu de fenol	0,024 g
- Agar-agar	15 g
- Apă distilată	1000 ml
pH = 7,4	

- Bacteriile de studiat.

Tehnica de lucru

Mediul trizaharat + fier se repartizează în eprubete (7 ml/eprubetă). Se sterilizează la 110°C timp de 15 minute. Se lasă să se răcească în poziție înclinată. Apoi eprubetele se însămânțează cu bacteriile de studiat. În urma incubării timp de 1-3 zile la 28° sau 37°C, în jurul coloniilor bacteriene apare o zonă neagră, dacă bacteria produce H₂S. Culoarea neagră se datorește FeS care apare ca produs al reacției.



11.3.3. Evidențierea descompunerii argininei

Acest test se folosește pentru identificarea unor streptococi. Din arginină se eliberează amoniac.

Material necesar:

- Mediu nutritiv care conține L-arginină
- Reactiv Nessler, care se prepară astfel:

Se mojurează 10 g HgJ₂ cu 3-4 ml apă distilată, până când se obține o pastă. La pastă se adaugă 5 g KJ și, după amestecare, se toarnă în doze succesive în total 100 ml soluție de KOH 20%. Pasta se amestecă încontinuu cu soluția de KOH. Se obține o soluție opalescentă. Soluția se păstrează în sticlă brună, iar după câteva zile se centrifughează (4000 rotații timp de 30 minute). Supernatantul clar se decantează într-o sticlă brună și reprezintă reactivul Nessler.

- Bacteriile de studiat.

Tehnica de lucru

Se prepară un mediu nutritiv care are următoarea compoziție:

Triptonă	5 g
Extract de drojdii	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
L-arginină (sub formă de monoclorhidrat)	3 g

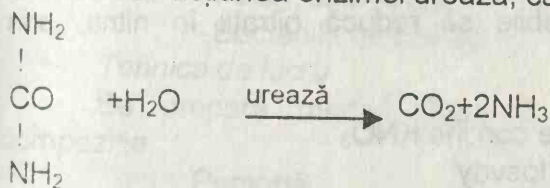
Glucoză
Apă distilată

0,5 g
1000 ml.

Ingredientele se dizolvă în apă, la cald. Se ajustează pH la 7. Se repartizează în eprubete (5-10 ml/eprubetă). Se autoclavează la 110°C, 20 de minute. Se însămânțează cu bacteriile de studiat. Incubarea se face la 28°C sau la 37°C, timp de 24-48 ore. După incubare în fiecare eprubetă se adaugă 3-5 picături de reactiv Nessler. Apariția unei culori brune indică prezența NH₃, deci hidroliza argininei.

11.4. Testul de hidroliză a ureei

Multe bacterii sunt capabile să descompună ureea. Hidroliza ei are loc sub acțiunea enzimei urează, care catalizează reacția:



Material necesar:

- Mediul nutritiv Christensen
- Soluție de uree 20% sterilă
- Pipete gradate sterile
- Culturi bacteriene.

Tehnica de lucru

Se prepară mediul Christensen, care are următoarea compoziție:

Glucoză	1 g
Peptonă	1 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Roșu de fenol	0,012 g
Agar-agar	20 g
Apă distilată	1000 ml
pH - mediul se ajustează la 6,8-7.	

Mediul se sterilizează în autoclav la 110°C, 20 de minute. Se repartizează în eprubete (5 ml/eprubetă). Se sterilizează din nou la 110°C, 20 de minute. Înainte de folosire mediul se lichefiază pe baia de apă. După ce se răcește la 50°C, în fiecare eprubetă se adaugă 0,2 ml soluție de uree 20%, cu ajutorul unei pipete gradate sterilizate. Sterilizarea ureei se face prin filtrare sau prin tindalizare (30 de minute, la 100°C, 3 zile consecutiv). După adăugarea ureei eprubetele se lasă

să se răcească în poziție înclinată. Mediul trebuie să aibă o culoare alb-gălbuie datorită pH-ului de 6,8-7.

În continuare, mediile se însămânțează cu bacteriile de studiat. După incubare la 28°C sau la 37°C se urmărește schimbarea culorii mediului nutritiv. Dacă bacteria însămânțată a produs hidroliza ureei, mediul se colorează în roșu, datorită virării roșului de fenol în prezența NH_3 , metabolit rezultat din descompunerea ureei.

11.5. Evidențierea proprietăților reducătoare, ale altor proprietăți biochimice ale bacteriilor

Vom menționa 8 din aceste proprietăți biochimice.

11.5.1. Evidențierea capacității de reducere a nitraților (Testul de denitrificare)

Multe bacterii sunt capabile să reducă nitrații în nitriți, prin enzimele pe care le posedă.

Material necesar:

- Mediu nutritiv care conține KNO_3
- Reactivul Griess-Ilosvay
- Culturile de studiat.

Tehnica de lucru

Se prepară un mediu nutritiv care are următoarea compoziție:

Peptonă	10 g
KNO_3	2 g
Apă distilată	1000 ml

Ingredienții se dizolvă prin încălzire. Apoi mediul se filtrează prin hârtie de filtru și se repartizează în eprubete (10 ml/eprubetă). Sterilizarea se face prin tindalizare (la 100°C, 30 de minute, în 3 zile consecutive). Bacteriile de studiat se însămânțează și apoi mediul se pune la incubat la 28°C, respectiv 37°C. După 3-5 zile de incubare se urmărește apariția nitriților rezultați din reducerea nitratului de K, cu ajutorul reactivului Griess-Ilosvay. Acest reactiv constă din două soluții:

Soluția 1:

α -Naftilamină	1 g
Apă distilată	22 ml

Se încălzește și se filtrează după care se adaugă 1 ml acid acetic glacial diluat (diluarea se face în următoarea proporție: 400 ml acid acetic+700 ml apă distilată).

Soluția 2:

Acid sulfanilic	0,5 g
Acid acetic diluat	150 ml.

În fiecare eprubetă se adaugă câte 5 picături din soluția 1 și 5 picături din soluția 2. Apariția unei colorații roz sau roșii indică prezența nitriților.

11.5.2. Reacția Voges-Proskauer

Unele bacterii pe mediul glucozat formează 2,3-butilenglicol (2,3-butandiol) din care prin dehidrogenare produc acetilmetilcarbinol numit și acetoină. Acetilmetilcarbinolul în prezența alcaliilor și a oxigenului atmosferic se oxidează în diacetil care reacționează cu peptona reziduală din mediu producând o culoare roz fluorescentă.

Material necesar:

- Mediul Clark și Lubs
- KOH, soluție 10%
- FeCl_3 , soluție 2%
- Bacteriile de studiat.

Tehnica de lucru

Se prepară mediul Clark și Lubs, care are următoarea compoziție:

Peptonă	5 g
Glucoză	5 g
K_2HPO_4	5 g
Apă distilată	800 ml

Ingredientele se dizolvă prin încălzire la 100°C , 20 de minute. Apoi mediul se filtrează prin hârtie de filtru. După răcire se aduce la volumul de 1000 ml cu apă distilată. În continuare se distribuie în eprubete (5 ml/eprubetă) și se sterilizează 3 zile consecutiv la 100°C , 30 de minute. Se însămânțează apoi cu bacteriile de studiat. După 48 de ore de incubare la 28°C sau 37°C se urmărește prezența acetilmetilcarbinolului. În acest scop în fiecare eprubetă se adaugă 5 ml KOH 10%. Citirea reacției se face după 24 de ore de incubare la 28°C sau 37°C . Dacă se adaugă o picătură de soluție de clorură ferică 2% înainte de adăugarea KOH, se accelerează reacția, citirea putând fi făcută chiar după o oră de incubare la 28°C sau 37°C .

11.5.2.1. Metoda Voges-Proskauer modificată de Barrit

Principiul metodei. Acetilmetilcarbinolul rezultat din fermentația glucozei de către bacteriile studiate se pune în evidență cu alfa-naftol în prezența KOH.

Material necesar:

- Mediul nutritiv: bulion glucozat-fosfatat
- Alfa-naftol 6% în soluție alcoolică
- KOH 16%

- Pipete gradate sterile de 1-2 ml
- Eprubete Wassermann sterile
- Culturi bacteriene pe medii solide 24-48 ore

Tehnica de lucru

Se prepară mediul nutritiv lichid alcătuit din:

- | | |
|--------------------|---------|
| - Glucoză | 5 g |
| - K_2HPO_4 | 5 g |
| - Peptonă | 5 g |
| - H_2O distilată | 1000 ml |
| - pH – 7,5. | |

Mediul se repartizează în eprubete (5 ml/eprubetă). Se sterilizează în autoclav la 105°C, 20 de minute în 3 zile consecutive. Se însămânțează cu culturile bacteriene de studiat. Se incubează la 30°C, respectiv la 37°C, 24-28 ore. După incubare, din cultura bacteriană se transpune, în condiții sterile, 1 ml într-un tub Wassermann. Se adaugă apoi 0,5 ml de soluție alcoolică 6% de α -naftol și 0,5 ml soluție de KOH 16%. Se amestecă prin agitare cu cultura bacteriană. Se lasă în repaus câteva minute. Apariția unei colorații roșii după 5 minute indică reacția pozitivă.

11.5.3. Reacția la roșu de metil

Această reacție servește la demonstrarea concentrației ionilor de hidrogen, produși de bacterii în cursul procesului de metabolizare a glucozei într-un mediu glucozat și fosfatat.

Material necesar:

- Mediu Clark și Lubs
- Roșu de metil
- Bacteriile de studiat.

Tehnica de lucru

Se prepară mediul Clark și Lubs și se repartizează în eprubete (5 ml/eprubetă). Se sterilizează 30 de minute, la 100°C, 3 zile consecutiv. Se însămânțează cu bacteriile de testat. După incubare timp de 3-4 zile la 28°C sau 37°C, se adaugă 5 picături din reactivul roșu de metil, care se prepară din:

- | | |
|-----------------|--------|
| - Roșu de metil | 0,1 g |
| - Etanol 96° | 300 ml |
| - Apă distilată | 200 ml |

Apariția unei colorații roz sau roșii indică o reacție pozitivă (o concentrație ridicată de ioni de hidrogen), pe când apariția unei colorații galbene indică o reacție negativă.

11.5.4. Evidențierea catalazei la bacterii

Se poate face folosind culturi pe medii lichide sau solide.

Material necesar:

- Mediul nutritiv: bulion
- H_2O_2 3%
- Soluție de săpun 10%
- Culturi bacteriene

Tehnica de lucru

Eprubetele cu mediu nutritiv (5 ml/eprubetă) se însămânțează cu bacteria de studiat. După 2-3 zile de incubare la 28°C sau 37°C , în fiecare eprubetă se adaugă 3 ml H_2O_2 . În cazul unei reacții pozitive se produce o efervescentă datorită degajării de O_2 :



Reacția devine și mai evidentă, dacă înaintea adăugării de H_2O_2 în eprubetă introducem 5 ml dintr-o soluție de săpun 10%.

11.5.5. Evidențierea descompunerii fenilalaninei

Este un test important pentru a deosebi grupul *Proteus* și *Providencia* de celelalte enterobacterii. Acest grup posedă capacitatea de a dezamina fenilalanina la acid fenilpiruvic:

Material necesar:

- Apă de robinet sterilă
- DL-fenilalanină, soluție 0,2%
- Roșu de fenol
- Na_2CO_3 , soluție 10%
- Acid sulfuric 10%
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Sulfat feriamoniacal
- Bacteria de studiat.

Tehnica de lucru

Se execută o suspensie densă a bacteriei de studiat în 0,5 ml apă de robinet sterilă. Se adaugă 0,5 ml DL-fenilalanină 0,2%. Apoi se introduce o picătură de roșu de fenol și carbonat de Na 10% suficient pentru a se crea o slabă alcalinitate. Eprubetele se închid și se pun la incubat la $33-37^\circ\text{C}$, în poziție orizontală, timp de 4 ore. Se adaugă acid sulfuric 10% până când culoarea se schimbă în roz slab. Se saturează cu sulfat de amoniu. În continuare se adaugă 5 picături soluție de sulfat

feriamoniacal pe jumătate saturată. Se agită bine. O culoare verzuie variind în intensitate indică formarea acidului fenilpiruvic.

11.5.6. Testul de oxidare-fermentare (testul Hugh și Leifson)

Multe bacterii metabolizează glucoza oxidativ, adică oxigenul este ultimul acceptor de hidrogen. În acest caz bacteria este aerobă. Alte bacterii fermentează glucoza, când acceptorul de hidrogen este o altă substanță, iar bacteria poate fi aerobă sau anaerobă.

Material necesar:

- Mediul Hugh și Leifson
- Glucoză
- Albastru de bromtimol soluție 0,2%
- Vaselină sterilă
- Culturi bacteriene de studiat

Tehnica de lucru

Se prepară mediul Hugh și Leifson, care are următoarea compoziție:

Peptonă	2 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Agar-agar	4 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă la cald toate ingredientele și se ajustează pH la 7,1. Se adaugă apoi 15 ml albastru de bromtimol soluție 0,2 % și 10 g de glucoză. Se repartizează în eprubete cu diametrul de 1 cm sau chiar mai mic (eventual în tuburi Weinberg) câte 18 ml/eprubetă. Se sterilizează la 110°C, 20 de minute. Înainte de întrebuințare mediul se fierbe pe baia de apă timp de 10 minute pentru a se elimina oxigenul.

După răcire se inoculează cu acul bacteriile de studiat. Incubarea se face atât în condiții de aerobioză cât și în condiții de anaerobioză (de obicei se adaugă 2 ml de vaselină topită sterilă în eprubetele inoculate). După incubare se urmărește dacă a avut loc producerea de acid. Dacă producerea de acid a avut loc numai în eprubetele incubate în condiții de aerobioză atunci se poate vorbi de un metabolism oxidativ, iar dacă s-a produs acid atât în condiții de aerobioză cât și în condiții de anaerobioză atunci bacteria are un metabolism fermentativ.

11.5.7. Evidențierea oxidării gluconatului

Se utilizează pentru diferențierea enterobacteriilor, în special grupul *Klebsiella* de grupul *Enterobacter*.

Material necesar:

- Mediu nutritiv cu gluconat

- Reactiv Benedict, care se compune din două soluții:

a/. 100 g Na_2CO_3 anhidru+200 g citrat trisodic sau tripotasic+125 g sulfocianură de K se dizolvă la cald în 800 ml apă distilată; se filtrează;

b/. 18 g CuSO_4 se dizolvă în 100 ml apă distilată. Se amestecă încet soluția b cu a, agitând tot timpul și se adaugă 5 ml soluție de ferocianură de K 5%. Se completează cu apă distilată până la 1000 ml. Reactivul este stabil și se poate păstra multă vreme.

- Culturi bacteriene de testat.

Tehnica de lucru

Se prepară mediul nutritiv, care are următoarea compoziție:

- Extract de drojdie	1 g
- Peptonă	1,5 g
- K_2HPO_4	1 g
- Gluconat de K sau	40 g
- Gluconat de Na	37,25 g
- Apă distilată	1000 ml.

Ingredientele se dizolvă la cald. Se ajustează pH la 7. Se filtrează și se repartizează în eprubete (5-10 ml/eprubetă). Se sterilizează la 115°C , 20 de minute. În continuare se inoculează bacteriile de studiat. După 48 ore de incubare la 37°C se adaugă reactivul Benedict în aceeași cantitate ca și mediul din eprubetă. Eprubetele se fierb apoi 10 minute. Apariția unui precipitat portocaliu sau brun indică oxidarea gluconatului.

11.5.8. Evidențierea citocromoxidazei

Material necesar:

- Mediul nutritiv: geloză simplă în tuburi înclinate
- Oxalat de *p*-dimetilaminoanilină, soluție apoasă 1 %
- α -naftol, soluție alcoolică 1%
- Culturi bacteriene (*Pseudomonas* pentru variante acromogene)

Tehnica de lucru

Se însămânțează bacteria de studiat pe geloză înclinată. Se incubează la temperatura optimă 24-48 de ore. Apoi se adaugă câteva (3) picături de oxalat de *p*-dimetilaminoanilină, soluție proaspăt preparată și 3 picături de soluție alcoolică de α -naftol. Cei doi reactivi trebuie să irige cultura. O colorație albastră. puternică care apare după 30-60 secunde indică o reacție pozitivă (prezența citocromoxidazei în celula bacteriană). Reacțiile pozitive care apar peste 1 minut de la adăugarea reactivilor nu se iau în considerare.

11.6. Teste de cultivare pe medii care conțin substanțe asimilabile numai de anumite bacterii sau substanțe toxice la care numai unele bacterii sunt rezistente

11.6.1. Testul cultivării pe mediul cu citrat de sodiu

Material necesar:

- Mediul Simmons
- Albastru de bromtimol, soluție alcoolică 1%
- Culturi bacteriene.

Tehnica de lucru

Se prepară mediul Simmons, care are următoarea compoziție:

NaCl	5 g
MgSO ₄	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Citrat de Na	2,77 g
Agar-agar	15 g
Apă distilată	1000 ml.

Se dizolvă sărurile în apă, se adaugă agarul și se autoclavează la 100°C, 20 de minute. Apoi se ajustează pH la 6,8. Ulterior se adaugă 4 ml dintr-o soluție alcoolică de albastru de bromtimol. Se repartizează mediul în eprubete (7 ml/eprubetă). Se sterilizează la 120°C, 20 de minute, după care mediul se solidifică în poziție înclinată. În continuare eprubetele cu mediu se însămânțează cu bacteriile de studiat. Dacă bacteria însămânțată are capacitatea de a folosi citratul drept unică sursă de carbon, cultura se dezvoltă, virând în albastru culoarea mediului (alcalinizându-l).

11.6.2. Testul cultivării pe mediu cu KCN

Material necesar:

- Mediu Möller
- KCN soluție apoasă 0,5 %
- Tulpini de cercetat

Tehnica de lucru

Se prepară mediul Möller cu următoarea compoziție:

Peptonă	3 g
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	0,225 g
NH ₄ H ₂ PO ₄ •2H ₂ O	1 g
Apă distilată	1000 ml

După dizolvarea substanțelor, se ajustează pH la 7,6. Se sterilizează prin autoclavare (120°C, 20 de minute). La mediul răcit se adaugă 15 ml soluție de KCN 0,5 %. Se repartizează apoi în condiții de

sterilitate, în tuburi de hemoliză (1 ml/tub). Tuburile se închid cu dopuri de plută, sterilizate în prealabil în parafină topită (în acest mod, mediul poate fi păstrat la 4°C, timp de două săptămâni). Tulpina de cercetat se însămânțează cu ansa din cultura de 24 de ore în bulion. Concomitent se însămânțează și tuburile cu mediu martor, care nu conțin KCN. Tuburile însămânțate se pun la incubat, la 37°C, timp de 4 zile. Citirea rezultatelor se face zilnic. Dezvoltarea culturii demonstrează rezistența acesteia la acțiunea KCN (reacție pozitivă).

11.6.3. Testul cultivării pe mediu cu malonat

Material necesar:

- Mediu cu malonat
- Albastru de bromtimol 0,2%
- Culturi bacteriene de testat

Tehnica de lucru

Se prepară mediul nutritiv cu malonat având următoarea compoziție:

K_2HPO_4	0,6 g
KH_2PO_4	0,4 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
NaCl	2 g
Extract de drojdie	1 g
Malonat de Na	2 g
Apă distilată	1000 ml

Ingredientele se dizolvă la cald. Se filtrează. Se adaugă 12 ml de albastru de bromtimol 0,2%. Mediul se repartizează în eprubete (5-10 ml/eprubetă) și se sterilizează la 115°C, 20 de minute.

Tulpinile de studiat se însămânțează pe acest mediu. Incubarea durează 24 de ore la 37°C. Creșterea și o colorație albastră intensă indică utilizarea malonatului.

11.7. Teste enzimatic

11.7.1. Testul fosfatazei

Este foarte important pentru identificarea stafilococilor și a micrococilor.

Material necesar:

- Geloză simplă
- Fenoltaleinfosfat 1%
- Tulpini de cercetat

Tehnica de lucru

La 100 ml geloză simplă lichefiată și răcită la 50°C se adaugă 1 ml soluție de fenoltaleinfosfat 1%, sterilizată în prealabil prin filtrare. Se

amestecă bine și se toarnă în cutii Petri. Acestea se țin în frigider cel puțin o săptămână. Apoi se inoculează tulpinile de studiat și se țin la incubat la 37°C, 24 de ore. Apoi se expun la vapori de amoniac. Coloniile fosfatazo-pozitive vor deveni roz datorită fenolftaleinei libere.

11.7.2. Testul coagulazei

Prezența unei enzime - coagulaza - care să coaguleze plasma este o proprietate exclusivă a lui *Staphylococcus aureus*.

Există două căi pentru realizarea acestui test: 1. testul coagulazei pe lamă și 2. testul coagulazei în tuburi.

11.7.2.1. Testul coagulazei pe lamă

Material necesar:

- Plasmă umană; de iepure sau de cal
- Culturi bacteriene
- Lame de microscopie

Tehnica de lucru

Se emulsionează 1-2 colonii într-o picătură de apă pe lamă. Nu trebuie să se producă grămezi (mase celulare aglutinate), în 10-20 de secunde. Se introduce o ansă dreaptă în plasma de om sau iepure, apoi cu ansa scoasă din plasmă se amestecă emulsia bacteriană. *Staph. aureus* aglutinează, cauzând apariția în 10 secunde a grămezilor vizibile. Se folosește apă în locul soluției saline întrucât unii stafilococi sunt sensibili la NaCl mai ales dacă au fost cultivați în medii saline. Trebuie evitat excesul de plasmă (de exemplu cantitatea ce s-ar ridica cu inelul ansei), deoarece acesta poate da reacție fals pozitivă. Plasma de om sau de iepure folosită se controlează cu un stafilococ la care se cunoaște că reacția coagulazei este pozitivă.

11.7.2.2. Testul coagulazei în tuburi

Acesta se execută pentru a confirma testul coagulazei pe lamă.

Material necesar:

- Mediu nutritiv: bulion
- Plasmă de om sau de iepure
- Culturi bacteriene.

Tehnica de lucru

La 0,8 ml bulion se adaugă 0,2 ml plasmă, într-un tub de hemoliză. Se inoculează cu tulpinil de *Staphylococcus* la care testul pe lamă n-a fost concludent. Se pune la incubat la 37°C, pe baia de apă, timp de 6 ore. Se examinează după fiecare jumătate de oră de incubare. *Staphylococcus aureus* produce un cheag, gelificând întregul conținut al tubului sau formând o rețea moale de fibrină. O incubare mai

lungă poate duce la dispariția cheagului datorită digestiei acestuia (fibrinolizei).

Testul coagulazei pe lamă detectează coagulaza legată care acționează asupra fibrinogenului în mod direct; testul coagulazei în tuburi detectează coagulaza liberă care acționează asupra fibrinogenului în legătură cu alți factori din plasmă.

11.7.3. Testul arilsulfatazei

Prin acest test se demonstrează capacitatea bacteriilor de a scinda esterii sulfurici. Prezintă importanță pentru studiul micobacteriilor.

Material necesar

- Mediul nutritiv Dubos
- Fenoltaleinsulfat de K 0,64%
- Carbonat de Na soluție 0,5 M
- Amoniac conc.
- Culturi de studiat.

Tehnica de lucru

Se prepară mediul Dubos cu următoarea compoziție:

KH_2PO_4	1 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	6,25 g
Citrat trisodic	1,25 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,6 g
Asparagină	2 g

Toate substanțele se dizolvă în ordinea dată, în 800 ml apă distilată. Apoi se mai adaugă:

Tween 80	0,5 ml
Cazeină sau lactalbumină hidrolizată soluție 20%	10 ml

În final volumul mediului se aduce la 1 litru cu apă distilată. Se ajustează pH la 7,4. Se repartizează în baloane (100 ml/balon), apoi se autoclavează (110°C, 20 de minute). În momentul folosirii se mai adaugă 4 ml dintr-o soluție sterilă de albumină bovină fracțiunea V 9%, și se repartizează în balonașe mici, în condiții aseptice. În continuare se prepară soluția de fenoltaleinsulfat de K în apă și se sterilizează prin filtrare. La 2,7 ml mediu Dubos se adaugă 0,3 ml fenoltaleinsulfat de K. Se pune la termostat, la 37°C pentru 24 ore, în scopul verificării sterilității. Se inoculează mediile cu mult material, având probe paralele. Incubarea durează 14 zile, la 37°C. Se urmărește prezența fenoltaleinei libere produsă sub acțiunea sulfatazei, din substrat, prin adăugarea a 0,5 ml de carbonat de Na M/5 sau a 0,5 ml amoniac conc. Rezultatele variază de la negativ (fără culoare) până la puternic pozitiv (culoare roșie-purpurie).

11.7.4. Evidențierea activității lipolitice

Activitatea lipolitică se poate studia:

1. pe mediu cu tributirină
2. în plăci cu geloză în care se emulsionează în momentul turnării o anumită cantitate de ulei de floarea soarelui steril.
3. prin hidroliza Tween 80
4. prin folosirea colorantului albastru Victoria.

11.7.4.1. Evidențierea activității lipolitice pe mediu cu tributirină

Material necesar:

- Mediu cu tributirină
- Tulpinile de studiat

Tehnica de lucru

Se prepară un mediu nutritiv cu tributirină care are următoarea compoziție:

Peptonă	5 g
Extract de drojdie	3 g
Tributirină	10 g
Agar-agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzește până se dizolvă toate ingredientele. Se ajustează pH la 7,5. Eprubetele sau baloanele cu mediu se sterilizează la 115°C, 15 minute. Se însămânțează cu bacteriile de studiat. După incubare (5 zile) la 28°C sau 37°C se urmărește clarificarea mediului în jurul coloniilor. O zonă clară apărută în jurul coloniei demonstrează prezența unei activități lipolitice.

11.7.4.2. Evidențierea activității lipolitice în plăci cu geloză cu ulei steril

Material necesar:

- Mediu nutritiv: geloză simplă
- Ulei de floarea soarelui steril
- Cutii Petri sterile
- CuSO_4 , soluție saturată
- Tulpinile de studiat.

Tehnica de lucru

Se toarnă geloză simplă în plăci Petri sterile, iar în momentul terminării se emulsionează o anumită cantitate de ulei de floarea soarelui steril (5 ml). Se însămânțează tulpinile de studiat în striuri. După o incubare de câteva zile (3-5) placa Petri se acoperă cu soluție saturată de CuSO_4 . Când au trecut 30 de minute, se îndepărtează excesul de sulfat de cupru, iar cu ajutorul unei lupe se examinează

picăturile de ulei. Dacă o tulpină produce lipază, picăturile de ulei de sub striuri se colorează intens în albastru deschis.

11.7.4.3. Hidroliza Tween 80

Principiul metodei. Tween 80 (poliioxietilen sorbitanmonooleat) este un detergent neionic, a cărei metabolizare oferă informații globale privind capacitatea bacteriilor de a sintetiza exoenzime lipolitice (lipaze, esteraze).

Tehnica de lucru

Se prepară un mediu nutritiv cu următoarea compoziție:

- Peptonă Difco	1 g
- NaCl	0,5 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
- Tween 80	1 g
- Agar-agar	1,5 g
- H_2O distilată	100 ml

Sterilizare: 30 de minute la 120°C , în eprubete (20 ml/eprubetă). Mediile se lichefiază pe baia de apă. Se toarnă în cutii Petri. Se însămânțează cu bacteriile de studiat (*Bacillus subtilis*, *Staph. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *Proteus vulgaris* etc.). Incubarea are loc la 37°C , 24-72 ore.

Reacția pozitivă: opacitatea mediului în jurul coloniilor. Se eliberează acidul oleic din Tween care reacționează cu ionii de Ca și formează oleatul de Ca (opac). Dacă nu apare opacitatea în jurul coloniilor, reacția este negativă.

11.7.4.4. Evidențierea hidrolizei lipidelor prin utilizarea colorantului albastru Victoria

Principiul metodei. Lipidele emulsionate în mediul de cultură (ulei de floarea soarelui, margarină sau unt) reprezintă substratul enzimatic al lipazelor produse de microorganisme. Soluția saturată de CuSO_4 reacționează cu acizii grași rezultați din hidroliza lipidelor, formând săruri de Cu insolubile, de culoare verde-albăstruie, care se colorează intens în albastru cu colorantul albastru Victoria.

Tehnica de lucru

Se prepară un mediu nutritiv cu următoarea compoziție:

- Peptonă	1,5 g
- Extract de drojdii	0,5 g
- NaCl	0,5 g
- H_2O distilată	100 ml
- Agar-agar	1,5 g
- Albastru Victoria	0,006 g

Se repartizează în eprubete (20 ml/eprubetă) și se sterilizează la 120°C, 30 de minute. Mediul va fi colorat într-o nuanță de mov. În momentul întrebuițării mediul se lichefiază pe baia de apă, apoi se adaugă 1 ml ulei steril care se emulsionează prin agitare cu mediul nutritiv, folosind un dop de cauciuc sterilizat. Se toarnă apoi într-o cutie Petri sterilă. După solidificare se însămânțează cu bacteriile de studiat (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus vulgaris*, *Streptomyces sp.*, respectiv cu specii de *Candida* (*Candida lypolytica*).

Incubarea se realizează la 28-30°C, 2-10 zile. După incubare, pe suprafața plăcilor Petri se adaugă cca 2 ml de soluție saturată de CuSO_4 . Se lasă câteva minute, după care excesul de lichid se îndepărtează (se colectează într-o soluție dezinfectantă de bicromat de K 5%). Dacă microorganismul studiat prezintă activitate lipolitică, zonele de lipoliză din jurul coloniilor se colorează intens în albastru. Intensitatea colorației este direct proporțională cu intensitatea activității lipazice.

11.7.5. Testul oxidazei

Material necesar:

- Benzi de hârtie de filtru îmbibate în hidroclorură de tetrametil-*p*-fenilendiamină, soluție 1%.
- Culturi tinere ale bacteriilor de testat.

Tehnica de lucru

Benzile de hârtie de filtru se îmbibă cu o soluție 1% de hidroclorură de tetrametil-*p*-fenilendiamină. Unele benzi capătă o culoare albastră și trebuie eliminate. Se usucă sau se folosesc umede. Cultura de testat se întinde cu ansa pe o astfel de bandă. Apariția unei culori albastre în 10 secunde indică o reacție pozitivă. Culturile mai vechi nu dau reacții concludente. Teluritul inhibă oxidarea.

12. STUDIUL ANTAGONISMULUI MICROBIAN

Multe microorganisme pot elimina substanțe specifice care omoară sau împiedică multiplicarea altor specii (efect bacteriostatic, bactericid, fungicid, fungistatic). Această formă de relație antagonică se numește antibioză, iar substanțele în cauză antibiotice.

Principiul metodei. Dacă inoculăm microorganismul producător de substanțe inhibitoare pe suprafața unui mediu solid, antibioticul difuzează în mediu și acționează specific asupra celulelor aparținătoare altei specii inoculate.

Materiale și medii nutritive

1. Microorganisme utilizate pentru test:

Escherichia coli, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Streptomyces griseus*, *Candida utilis*, *Penicillium chrysogenum*, toate în culturi de 3 zile pe mediul T 1 (bulion peptonat cu glucoză și extract de drojdie).

2. Mediu nutritiv agarizat (bulion peptonat) cu agar 3%.

3. Cutii Petri sterile

4. Eprubete cu soluție izotonică de NaCl 0,85% 1 ml/eprubetă, respectiv 3 ml/eprubetă.

Tehnica de lucru

Mediul nutritiv agarizat se lichefiază pe baia de apă sau în autoclav la 105°C, 30 de minute, după care se răcește la 50°C și se toarnă în 10 cutii Petri sterile. După solidificare, în câte două cutii se însămânțează următoarele microorganisme: 1. *Ps. aeruginosa*; 2. *E. coli*; 3. *Bacillus subtilis*; 4. *Streptomyces griseus* și 5. *Pen. chrysogenum*. Inocularea se realizează în linie, dintr-o suspensie microbiană realizată în ser fiziologic steril. Cutiile se pun la incubat pentru 48 ore la 28-30°C. După acest interval de incubare, cutiile se scot și, în condiții aseptice, se inoculează cu microbii test (de ex. *Staph. aureus* pentru bacteriile Gram-pozitive și *Klebsiella pneumoniae* pentru bacteriile Gram-negative). Se va avea grijă ca la inocularea cu microorganismul test ansa de însămânțare să nu atingă cultura deja dezvoltată de microorganism producător de antibiotice. Cutiile astfel inoculate se introduc din nou în termostat, pentru încă 48 de ore. După acest interval, se evaluează rezultatele prin notarea efectului antagonic. Se trec rezultatele calitative într-un tabel și se măsoară în mm zona de inhibiție apărută.

12.1. Acțiunea inhibitoare a unor ioni metalici asupra înmulțirii microorganismelor

Principiul metodei. Ionii unor metale grele ca Ag, Cu, Ni, Pb au acțiune toxică asupra microorganismelor chiar și în concentrații foarte mici. Ionii metalelor vor difuza în mediul nutritiv solidificat cu agar-agar și vor determina apariția unor zone de inhibiție. Mărirea zonei caracterizează gradul de toxicitate.

Materiale necesare

- Microorganisme utilizate: *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Saccharomyces cerevisiae*, culturi de 48 de ore pe bulion peptonat agarizat.
- Mediu nutritiv solidificat cu agar-agar 3 %
- Monede cu conținut de Cu, Ag, Pb, Al
- Cutii Petri sterile
- Eprubete cu 10 ml apă sterilă
- Apă distilată sterilizată (500 ml)
- HNO_3 concentrat
- Discuri sterile de hârtie de filtru calitativă (se recomandă hârtia Whatmann 3) cu diametrul de 0,5 cm
- Soluție 5% de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$
- Benzi (fâșii) de hârtie de filtru sterile.

Tehnica de lucru

Cu o soluție 25 % de acid azotic se curăță suprafața a 3 monede din fiecare tip, folosindu-ne de un tampon de vată și o pensetă. Se clătesc apoi monedele în apă sterilă. Monedele apoi se așează în 3 cutii Petri sterile în așa fel încât toate cutiile să conțină, dacă există posibilități, câte o monedă de Cu, Pb, Al, Ag. Distanța dintre monede trebuie să fie de cel puțin 3 cm. După așezarea monedelor în cutiile Petri, în condiții aseptice, se adaugă apoi în fiecare cutie 20 ml mediu nutritiv agarizat lichiefiat. Vor exista și 3 cutii martor, fără monede. După solidificare se inoculează fiecare cutie cu câte o cultură microbiană (prin metoda inoculării masive). Se prepară o suspensie densă, vizibilă cu ochiul liber, în ser fiziologic steril, din care se însămânțează un volum de 5 ml. Excesul de lichid inoculat se îndepărtează în vasul cu lichid dezinfectant, folosindu-se și fâșii de filtru sterile. Cutiile astfel inoculate se pun la incubat în termostat, la 28-30°C, pentru 48 de ore. După incubare se notează efectul inhibitor al metalelor prin apariția unei zone de inhibiție în jurul monedelor folosite. Acestea se notează într-un tabel, stabilindu-se și mărirea zonei de inhibiție.

În cutiile Petri însămânțate cu bacteriile test se pot introduce discurile de hârtie de filtru îmbibate cu azotat de mercur, ca martor servind discuri îmbibate cu apă distilată. Se citesc rezultatele, după o incubare de 48 de ore, la 30°C. Se redau, într-un tabel, datele obținute pentru fiecare specie de microorganism în parte.

13. DETERMINAREA SENSIBILITĂȚII MICROORGANISMELOR LA ACȚIUNEA UNOR SUBSTANȚE ANTIMICROBIENE

13.1. Determinarea sensibilității microorganismelor la antibiotice (antibiograma)

Antibioticele sunt substanțe chimice de origine biologică sau sintetică, capabile de a distruge selectiv unele microorganisme sau de a le împiedica multiplicarea. Unii autori includ și substanțele sintetice în categoria substanțelor antimicrobiene.

Acțiunea antibioticelor este selectivă, însă spectrul lor de acțiune, poate fi larg, relativ limitat sau îngust. Astfel, tetraciclinele, cloromicetina au un spectru larg, penicilina, eritromicina și bacitracina - un spectru relativ limitat, iar polimixinele și nistatina au un spectru îngust.

După cum au un spectru mai mult sau mai puțin larg, antibioticele afectează bacteriile Gram-pozitive, Gram-negative sau acidorezistente. Asupra virusurilor și în special asupra celor de dimensiuni mici, antibioticele nu au acțiune evidentă.

Acțiunea antibioticelor cunoaște ca mecanism esențial bacteriostaza, ele inhibă dezvoltarea germenilor sensibili însă nu-i omoară. În anumite condiții, unele antibiotice pot fi și bactericide.

Cercetarea sensibilității microorganismelor la antibiotice poate fi efectuată fie cu ajutorul metodelor de diluție în mediul lichid, fie prin metode difuzimetrice pe medii solide.

13.1.1. Metoda diluțiilor în medii lichide

Principiul metodei. Se însămânțează o cantitate fixă din cultura de cercetat în diluții crescânde de antibiotic și se stabilește diluția de antibiotic care inhibă tulpina de cercetat.

Material necesar:

Diluțiile de antibiotic. Se vor prepara direct în mediul nutritiv lichid. Se prepară numai în momentul folosirii lor, întrucât antibioticele dizolvate se inactivează foarte ușor. Concentrațiile maxime de antibiotice de la care se pleacă sunt: penicilină (100 u.i. /ml), streptomycină (100 μ g /ml), cloromicetină (10 μ g/ml), tetraciclină (10 μ g/ml).

² Penicilina este titrată în unități internaționale (u.i.) de penicilină, o unitate fiind egală cu activitatea oferită de către 0,6 μ g din benzilpenicilatul de Na față de *Staph. aureus* tulpina Oxford. Unitatea internațională reprezintă etalonul

Mediul de cultură. Se folosește apă peptonată 2%, glucozată 1%, având pH 7,4-7,6. Când se utilizează aureomicină sau sulfamide se va folosi numai bulion glucozat 1% (fără peptonă), având pH 7,4-7,6, la care se mai poate adăuga, în momentul folosirii, un lichid organic (ser, sânge, lichid de ascită). Acest mediu se va folosi și pentru testarea sensibilității la antibiotice a unor germeni mai exigenți cum sunt: brucelele, pneumococii, streptococii etc.

Cultura bacteriană de testat. Se prepară în felul următor: dintr-o cultură în bulion de 18-20 ore se ia o picătură și se diluează cu 10 ml ser fiziologic steril. O picătură din această diluție se amestecă cu încă 1 ml de ser fiziologic steril. Această ultimă diluție servește la însămânțarea tuburilor.

Tehnica de lucru

Se utilizează 12 tuburi de hemoliză pentru fiecare antibiotic de cercetat. Se pipetează în fiecare tub, cu excepția primului, câte 0,5 ml mediu de cultură. Se adaugă apoi câte 0,5 ml mediu conținând antibioticul de studiat (de ex. penicilină 100 u.i./ml) în tuburile 1 și 2. Din tubul al 2-lea, după omogenizare, se trec 0,5 ml în tubul al 3-lea. După agitare, din tubul al 3-lea se trec 0,5 ml în tubul al 4-lea și așa mai departe până la tubul 11. Din tubul 11 se scot 0,5 ml și se aruncă. În tubul 12 nu se adaugă amestec cu antibiotic diluat, rămânând drept martor. Se însămânțează apoi toate tuburile cu câte o picătură din diluția culturii de testat. Redăm în tabelul nr.4 schema preparării acestor amestecuri.

internațional, propus și păstrat la Institutul Național de Cercetări Medicale din Londra.

³ O unitate de streptomicină reprezintă 1/1.000.000 g (1 mg streptomicină = 1000 u, 1 mg sulfat de streptomicină = 800 u, 1 mg clorhidrat de streptomicină = 834 u). Streptomicina se titrează față de *Klebsiella pneumoniae*.

Tabelul 4.

Schema preparării amestecurilor pentru metoda diluțiilor în
mediul lichid

Material adăugat	Numărul tubului											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mediul nutritiv (ml)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Soluție penicilină (100 u.i.)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Diluție din culturile de testat	o picătură în fiecare tub											
Diluțiile finale de penicilină în u.i.	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	

În tubul 12 (martor) se controlează capacitatea de creștere a tulpinii pe mediul utilizat.

Se recomandă și utilizarea unei tulpini bacteriene standard, a cărei sensibilitate la antibiotice este cunoscută, ca de pildă stafilococul Oxford. Citirea rezultatelor se face după 18-20 de ore de incubare la 37°C. Pe baza turbidității mediului se apreciază sensibilitatea sau rezistența tulpinii studiate la antibioticul dat. Ultimul tub limpede va indica cea mai mare diluție de antibiotic (concentrația minimă de antibiotic) necesară, *in vitro*, pentru inhibarea tulpinii testate. Această metodă prezintă avantajul că poate da indicații atât asupra sensibilității tulpinii testate, cât și asupra concentrației minime de antibiotic necesară, *in vitro* pentru inhibarea ei.

O variantă a metodei descrise mai sus este *metoda rapidă în mediul lichid*. Mediul lichid folosit este bulionul glucozat 1%, la care se adaugă o soluție apoasă 0,1% roșu de fenol, până se obține o culoare roșie netă. Mediul se repartizează în tuburi de hemoliză (2 ml/tub) și se sterilizează la 110°C, timp de 20 de minute. În fiecare tub se mai adaugă apoi 0,1 ml dintr-o serie de diluții de antibiotic. Se folosesc diluții de antibiotic între 200 și 1000 μg pentru toate antibioticele, cu excepția penicilinei, care se utilizează în cantități de 5-10 ori mai mici.

Cultura bacteriană de testat se prepară ca și în cazul metodei mai sus descrise. Se adaugă câte o picătură din aceasta în fiecare tub. Drept martor servește un tub fără antibiotic.

Seriile de tuburi astfel pregătite se introduc într-o baie de apă la 37°C. După 3 ore se face prima citire la tubul martor. Dacă culoarea mediului a virat în galben, reiese că bacteria a crescut bine, metabolizând glucoza. În acest caz se citesc toate tuburile. Dacă la martor virajul de culoare nu a apărut, citirea se face după 6 ore. În tuburile unde antibioticul studiat a avut un efect bacteriostatic, bacteria înșământată nu se dezvoltă și culoarea mediului rămâne roșie.

13.1.2. Metodele difuzimetrice

Sunt metodele cele mai simple. Sunt rapide și ușor de executat, permițând o orientare suficientă pentru nevoile practice (clinice). Prezintă avantajul că pot fi utilizate pentru aproape toate substanțele antimicrobiene. Ele se bazează pe proprietatea antibioticelor de a difuza în geloză, creând o zonă circulară în care concentrațiile de antibiotice sunt descrescând de la centru spre periferie. Dacă se lucrează cu cantități descrescând de antibiotic se poate aprecia sensibilitatea germenului studiat, prin comparație cu o tulpină standard, obținându-se o inhibare totală sau numai parțială. Acest procedeu are avantajul că dă indicații cantitative, dar în schimb este destul de laborios.

13.1.2.1. Metoda difuzimetrică cantitativă

Material necesar.

Diluțiile de antibiotic. Dacă lucrăm cu penicilină, se efectuează în apă distilată sterilă 6 diluții descrescând de la 0,5-0,015 u.i./ml, în așa fel ca să fie cuprinsă și concentrația de 0,03 u.i./ml, care se realizează în umorile organismului după administrarea dozelor obținute de penicilină. Cele 6 diluții de penicilină sunt: 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03 și 0,015 u.i./ml.

Când se testează sensibilitatea la alte antibiotice se procedează la fel ca și în cazul penicilinei, diferind doar concentrațiile de antibiotice folosite. Astfel, pentru streptomycină vom utiliza 125 mg sulfat de streptomycină, pe care le dizolvăm în 10 ml tampon fosfat (pH=6,3) și vom obține diluții finale de 100; 20; 10; 8; 4; 2 și 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Pentru tetraciclină (aureomicină, teramicină și hostaciclină) se prepară diluții în tampon fosfat (pH=6,3) de la 1,5 - 0,00125 $\mu\text{g/ml}$. Apoi din acestea se repartizează câte 0,1 ml în fiecare cutie Petri, obținându-se în final concentrațiile de 1,5-0,00125 $\mu\text{g/ml}$. La cloromicetină se lucrează cu concentrații de 5-0,3 $\mu\text{g/ml}$ la 10 ml geloză simplă.

Mediul de cultură: geloză simplă sau geloză-sânge.

Culturi bacteriene: Tulpina standard (cultură de 18-20 ore în bulion); tulpina de testat (cultură de 18-20 ore în bulion).

Tehnica de lucru

Se repartizează în culii Petri sterile, câte 1 ml din fiecare diluție. Se toarnă apoi 10 ml geloză simplă sau geloză-sânge. Se omogenizează bine cu diluția de penicilină. După solidificare, fiecare din cele 6 culii Petri este însământată cu ansa, într-o jumătate a cutiei cu tulpina standard de stafilococ Oxford, iar în jumătatea cealaltă a cutiei cu tulpina de studiat. Drept martor servește o cutie Petri cu geloză simplă sau geloză-sânge, care nu conține penicilină, însământată în mod asemănător cu cele două tulpini. Incubarea durează 24 de ore la 37°C. Sensibilitatea limită a tulpinii este apreciată după diluția cea mai mare de penicilină capabilă să inhibe creșterea acesteia.

13.1.2.2. Metodele difuzimetrice calitative

Se utilizează două metode: 1. metoda rondelilor și 2. metoda pulberilor cu antibiotice.

13.1.2.2.1. Metoda rondelilor

Material necesar:

Rondele impregnate cu antibiotice. Se utilizează rondelile din hârtie de filtru calitativă îmbibate cu antibiotice. Se pregătesc rondelile cu diametrul de 10 mm. Se sterilizează într-o cutie Petri, în etuvă. Se îmbibă apoi cu diluțiile de antibiotic, luând fiecare rondelă în parte cu o pensetă sterilă. Se îndepărtează excesul de lichid prin presarea ușoară a rondelii de pereții tubului. Se usucă apoi toate rondelile într-o cutie Petri sterilă la 37°C, timp de 30 de minute. Se așează în tuburi închise și se păstrează într-un exicator cu CaCl_2 , timp de câteva luni.

Diluțiile de antibiotic. Se prepară diferențiat. Se calculează cât lichid reține o rondelă. În general, o rondelă cu diametrul de 10 mm absoarbe 0,01 ml. Deci într-un ml de diluție se pot impregna circa 80 rondelile. Pentru impregnare, se folosesc cantități diferite de antibiotic în funcție de natura acestuia. Redăm mai jos dozele cel mai frecvent utilizate:

Penicilină	0,5 și 2 u.i./rondelă
Streptomicină	10 și 100 μg /rondelă
Cloromicetină	10 și 25 μg /rondelă
Tetraciclina	5 și 10 μg /rondelă.

Pentru obținerea diluțiilor necesare se pleacă de la următorul calcul: dacă o rondelă conține 10 gama antibiotic, atunci 80 rondelile vor conține 800 gama antibiotic/ml.

Mediul de cultură: geloză simplă.

Cultura bacteriană. Aceasta se obține din cultura de 18-20 ore în bulion a germenului studiat, care se diluează steril în bulion în următoarea proporție: 0,1 ml cultură bacteriană + 9,9 ml bulion.

Tehnica de lucru

În cutii Petri sterile se toarnă 20 ml geloză simplă, lichefiată și răcită la 50°C. După solidificare se însămânțează cu 0,5 ml din cultura microbiană diluată. Cutia se înclină în toate părțile pentru a se obține un strat uniform de cultură, iar excesul se îndepărtează cu o pipetă Pasteur sterilă. Se usucă cutiile în termostat la 37°C, timp de o oră. Apoi pe suprafața mediului se aplică rondelele de antibiotice (3-5 rondele/cutie). Incubarea durează 20-24 ore la 37°C. Citirea se face măsurând diametrul zonei de inhibiție (fig. 26) Cu cât acesta este mai mare, cu atât tulpina este mai sensibilă la antibioticul respectiv.

13.1.2.2.2. Metoda pulberilor cu antibiotice

Este tot o metodă difuzimetrică calitativă, asemănătoare cu cea precedentă, cu deosebirea că în locul rondelelor împregnate cu antibiotice se întrebuințează pulberi de antibiotice. Metoda prezintă avantajul că poate fi realizată cu ușurință în orice laborator.

Material necesar:

Amidon steril. Se utilizează amidon pur, care se sterilizează prin încălzire, în etuvă, la 60-65°C, timp de 30 de minute, în 3 zile consecutive.

Pulberi de antibiotice. Acestea se prepară din amidon steril și antibioticul respectiv. Descriem modul de preparare.

Penicilina. Conținutul unui flacon de penicilină G de 200.000 u.i. se amestecă cu 10 g amidon steril. Se omogenizează bine. Din acest amestec se ia 1 g care se amestecă cu 9 g amidon. Din acest amestec, numit și "pulbere-mamă" se ia 1 g care se amestecă cu 1 g amidon obținându-se astfel o pulbere care conține 1000 u.i./g pulbere. Pentru antibiogramă se folosește acest ultim amestec.

Streptomicina. Se amestecă 1 g streptomicină cu 9 g amidon. Din acest amestec se ia 1 g care se amestecă cu 9 g amidon. Acesta reprezintă "pulberea mamă". Un gram din acest ultim amestec omogenizat cu 1 g amidon are o concentrație de 5 mg/g pulbere.

Cloromicetina: Se prepară la fel ca și streptomicina

Tetraciclina. (Aureomicina, teramicina și hostaciclina). ○

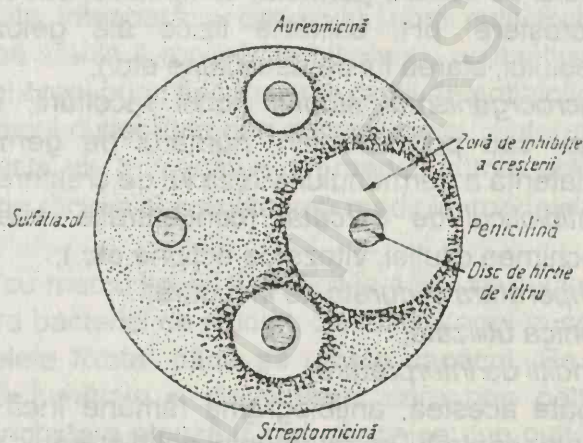


Fig.26. Citirea rezultatelor unei antibiograme

tabletă de 250 mg se mojarază cu 5 g amidon. 1 g din această pulbere se mojarază cu 9 g amidon, obținându-se pulberea de tetraciclină de utilizat care are o concentrație de 5 mg antibiotic la 1 g pulbere.

Sulfatiazolul. Se mojarază 4 tablete a 0,5 g fiecare cu 8 g amidon, obținându-se "pulberea-mamă". Un gram din această pulbere amestecat cu 1 g de amidon duce la obținerea pulberii de sulfatiazol de utilizat, care are o concentrație de 100 mg sulfatiazol/g pulbere.

Mediul de cultură: geloză simplă.

Cultura bacteriană: se obține ca și la metoda rondelilor.

Tehnica de lucru

Este identică cu cea descrisă la metoda rondelilor. În cutia Petri însămânțată cu tulpina de testat se vor depune, cu ajutorul unor ace spatulate, cantități mici și relativ egale din pulberile de antibiotice. Rezultatele se citesc după 20-24 ore de incubare la 37°C. Interpretarea lor se face prin măsurarea diametrului zonei de inhibiție.

Rezultatele obținute la determinarea sensibilității unui germen microbial la antibiotice, prin toate metodele descrise mai sus, variază în funcție de o serie de factori:

1. *mediul de cultură* (formulă, compoziție, substanțele nutritive și factori de creștere, pH, calitățile fizice ale gelozei întrebuințate, grosimea mediului, starea lui de uscăciune etc.);

2. *microorganismul studiat* (locul recoltării, însămânțarea ca produs mono- sau polimicrobial, numărul de germeni însămânțați, perioada de latență a germenului, viteza lui de creștere etc.);

3. *antibioticul de cercetat* (concentrație, viteza și gradul de difuziune, vechimea diluției, viteza de acțiune etc.);

4. *temperatura și durata de incubare;*

5. *tehnica utilizată;*

6. *condiții de interpretare.*

Cu toate acestea, antibiograma rămâne încă o metodă foarte prețioasă pentru controlul și tratamentul antibioterapic științific.

13.2. Determinarea sensibilității la antibiotice a bacteriilor anaerobe

În practică testarea sensibilității bacteriilor anaerobe la antibiotice este foarte puțin folosită. Acest lucru se datorește neexistenței unor metode bine puse la punct, pe de o parte, precum și dificultăților tehnice de realizare a acestora, pe de altă parte. Redăm mai jos metoda propusă în 1961 de un colectiv de cercetători de la Institutul I. Cantacuzino (I. Bittner, Viorica Voinescu și S. Antohi). Se folosește metoda rondelilor.

Material necesar:

Rondele îmbibate cu antibiotice. Se folosesc următoarele concentrații de antibiotice în apă distilată sterilă: penicilină 1 u.i./ml; streptomycină 5 μg/ml, cloromicetină 5 μg/ml, tetraciclină 5 μg/ml. Rondellele se prepară după tehnica descrisă la pag. 119. Se pot folosi rondelle

uscate (impregnate în prealabil cu antibiotice) sau rondele umede (impregnate proaspăt).

Mediul de cultură. Mediul de bază este bulionul cu ficat și carne, la care se adaugă acid tioglicolic în proporție de 0,06%. Acidul tioglicolic se adaugă cu scopul de a micșora potențialul de oxidoreducere (rH) din mediul de cultură la valori de rH=6-7, aproape de valorile necesare pentru creșterea bacteriilor strict anaerobe. Mediul este repartizat în baloane (40-50 ml/balon).

Tulpina de studiat. Este cultivată în mediu lichid anaerob, de obicei în bulion cu ficat și carne. Pentru însămânțare se folosesc 0,5-1 ml din cultura de 18 ore.

Tehnica de lucru

Pe suprafața interioară a capacului unei cutii Petri sterile se așează cu o pensă sterilă 4 rondele îmbibate cu antibiotice. Rondelele sunt numerotate și corespund fiecare unei diluții de antibiotic. Rondelele se fixează de capacul cutiei Petri prin depunerea cu ajutorul unei pipete Pasteur sterilă, peste ele a 3 picături din mediul nutritiv utilizat, lichefiat și răcit la 45°C. Prin răcirea și solidificarea mediului rondelele sunt fixate de capac.

Baloanele cu mediu lichefiat și răcit la 45°C se însămânțează cu 0,5-1 ml din cultura bacteriei de studiat. Se toarnă apoi în capacul cutiei Petri peste rondelele fixate, până se umple capacul. Se aplică apoi deasupra cealaltă jumătate a cutiei Petri, care prin pătrunderea în mediu asigură o închidere etanșă. După răcire se pun cutiile la incubat la 37°C. Prin această tehnică și datorită adaosului de acid tioglicolic se asigură anaerobioza. Citirea rezultatelor se face după 24-36 ore, prin numărarea diametrului zonei de inhibiție.

13.3. Determinarea concentrației antibioticelor în sânge și umori

Antibioticele din sânge și umori (lichid cefalorahidian, urină etc.) se dozează prin metode microbiologice folosind metoda diluțiilor seriate. Prin această metodă se determină concentrația minimă a antibioticelor din sânge și umori, capabilă să inhibe creșterea unui microorganism test, comparativ cu un etalon din antibioticul de studiat. În acest scop este necesar ca germenul folosit să prezinte următoarele însușiri:

- a) să fie foarte sensibil, adică să fie inhibat în dezvoltarea sa de concentrații cât mai mici de antibiotic;
- b) să fie puțin pretențios, fiind capabil să crească în ser sau alte umori cu un adaos minim de mediu nutritiv, întrucât folosirea

unor cantități mai mari de mediu nutritiv ar duce la o diluare prea mare a antibioticului din umorile de cercetat;

- c) creșterea să fie vizibilă, fie sub forma unui grad de turbiditate a mediului, fie prin schimbarea pH (când se folosește un indicator de pH).

De asemenea, trebuie să se țină seama și de puterea antimicrobiană normală a serului sanguin. În acest sens, se recomandă ca la serul de cercetat să se adauge soluție sterilă de licoid 0,5% (polianetolsulfonat de Na), care previne coagularea sângelui și blochează puterea bacterică a serului sanguin.

În cazul dozării streptomisinei, cloramfenicolului și a tetraciclinelor, serul poate fi inactivat și prin încălzirea la 56°C, fără să fie inactivat antibioticul. Dar acest tratament se va omite în cazul dozării penicilinei, care este sensibilă la căldură.

Recoltarea produselor (ser, lichid cefalorahidian, urină etc.) se face în condiții aseptice, iar efectuarea analizelor se realizează tot în condiții de asepsie.

Material necesar:

Mediul nutritiv. Mediul nutritiv folosit la testare are următoarea compoziție:

Bulion glucozat 0,5 % (pH=7,5)	1000 ml
Roșu de fenol, soluție apoasă 0,1% (sterilizată la 120°C, 20 de minute)	100 ml
Acid p-aminobenzoic 0,2% (sterilizat la 120°C, 20 de minute)	50 ml

Etalonul de penicilină. Se prepară în condiții de sterilitate, fie în apă distilată sterilă, fie în tampon fosfat steril. Diluțiile sterile de penicilină vor avea următoarele concentrații: 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03; 0,015 și 0,007 u.i./ml.

Tulpini bacteriene standard. Acestea trebuie să aibă o sensibilitate cunoscută și constantă. Se întrebuintează ca microorganisme test: *Staph.aureus* - tulpina Oxford și *Bacillus subtilis* tulpina Marburg. Stafilococul Oxford utilizat în acest scop se va trece săptămânal pe geloza înclinată, verificându-se periodic și gradul de sensibilitate și aspectul morfologic etc. Cu o zi înainte se face o diluție în bulion glucozat 0,5%, în proporție de 1:1000. Când se folosește *Bac.subtilis* tulpina Marburg, se va face o suspensie în ser fiziologic dintr-o cultură de 4-6 zile pe geloză simplă. Suspensia trebuie să fie ușor opalescentă și va fi ținută pe baie de apă la 65°C, timp de 30 de minute pentru distrugerea celulelor vegetative.

Tehnica de lucru

Determinarea se efectuează în 18 tuburi de hemoliză (9 pentru testarea propriu-zisă și 9 pentru scara etalon). Acestea se numerotează de la 1-9 (proba 9 reprezentând martorul). În fiecare tub din cele două serii se pipetează câte 1 ml de mediu nutritiv cu roșu de fenol. În seria de testat, în tubul nr.1 se introduce 1 ml din serul de cercetat, cu o pipetă gradată sterilizată. Se amestecă bine și apoi cu aceeași pipetă se trece din amestec 1 ml în tubul nr.2 și apoi se procedează în mod identic până la tubul nr.8. Din acesta, după omogenizare, se aruncă 1 ml. În tubul nr.9 nu se adaugă ser de cercetat, servind drept martor pentru verificarea creșterii tulpinii test. În acest mod am obținut o diluție finală a serului de cercetat de: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128 și 1:256.

În seria etalon se introduce în tubul nr.1 un ml de penicilină care conține 2 u.i./ml. Se amestecă și de aici se trece 1 ml în tubul nr.2 și așa mai departe, până la tubul nr.8, din care se aruncă 1 ml. Tubul nr.9 va servi și aici drept martor, pentru creșterea bacteriei test.

Apoi în fiecare tub din cele două serii se vor adăuga, cu o pipetă sterilă, câte două picături din cultura bacteriei test. Schema preparării acestor amestecuri este redată în tabelul nr.5 Tuburile se pun apoi la incubat pentru 18-20 ore, la 37°C. După incubare se urmărește dacă culoarea mediului a virat de la roșu spre galben. Martorul trebuie să prezinte întotdeauna un viraj net spre galben. Se citește care a fost concentrația limită de penicilină din seria etalon care a inhibat creșterea bacteriei test și de asemenea diluția limită de ser care a inhibat creșterea bacteriei test. Pentru a calcula numărul de unități de penicilină conținute într-un ml de ser cercetat se înmulțește valoarea concentrației limită de penicilină etalon cu numitorul fracției care reprezintă diluția limită a serului cercetat. Dăm un exemplu: valoarea concentrației limită a penicilinei etalon este de 0,03 u.i./ml, iar diluția limită a serului de cercetat este de 1/8, atunci $0,03 \times 8 = 0,24$ u.i./ml ser cercetat. Când serul de cercetat conține peste 1 u.i./ml ser se vor face diluții pentru penicilină-etalon, plecând de la 10 u.i./ml.

Pentru celelalte antibiotice se va proceda ca și în cazul penicilinei, cu deosebirea că în seria etalon se va pleca de la o diluție inițială care conține 1000 μg antibiotic/ml.

Tabelul 5

Compoziția amestecurilor pentru determinarea concentrației
antibioticelor din sânge

Materialul adăugat	Numărul tubului								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mediul nutritiv cu roșu de fenol (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ser de cercetat	1	1	1	1	1	1	1	se aruncă	
Cultură bacteriană	2 picături în fiecare tub								
Diluțiile finale ale serului	1/2	1/4	1/8	1/ 16	1/ 32	1/ 64	1/ 128	1/ 256	-

Seria etalon antibiotic

Materialul adăugat	Numărul tubului								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mediul nutritiv cu roșu de fenol (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Soluție etalon de penicilină (2 u.i./ml)(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	se aruncă
Cultură bacteriană test	2 picături în fiecare tub								
Diluția realizată	1/2	1/4	1/8	1/ 16	1/ 32	1/ 64	1/ 128	1/ 256	-

13.4. Detectarea antibioticelor în lapte, alte alimente și furaje

Laptele provenit de la animalele tratate cu antibiotice poate conține aceste substanțe antibacteriene. Antibioticele adesea se adaugă și pentru conservarea unor alimente. De asemenea se introduc în hrana unor animale (în furaje) și apoi pot apărea în produsele consumate de om. Dacă astfel de antibiotice se găsesc în laptele utilizat pentru fabricarea brânzeturilor, bacteriile lactice selecționate pot fi inhibitate, iar altele rezistente pot cauza alterarea sau schimbarea proprietăților organoleptice ale acestor produse. Există două metode pentru detectarea antibioticelor din lapte sau alte produse: metoda cu TTC și metoda rondelilor. Descriem metodele pentru lapte.

13.4.1. Metoda cu TTC (clorură de trifeniltetrazoliu)

Principiul metodei. Probele de testat se inoculează cu *Streptococcus thermophilus* și se pun la incubat la temperatura optimă (44-45°C) a acestei bacterii. Se adaugă apoi clorura de 2,3,5-trifeniltetrazoliu. Celulele capabile de metabolism reduc TTC la formazan. Celulele inhibitate de penicilină sau alt antibiotic nu se vor dezvolta și nu vor reduce TTC. Intensitatea colorației roșii este invers proporțională cu cantitatea de antibiotic existentă. Penicilina se mai poate determina și cu ajutorul penicilinazei.

Material necesar.

Probe de lapte pentru testat.

Cultura de *Streptococcus thermophilus*: se obține prin însămânțarea acestuia în lapte cu peptonă 1% și incubat la 35-37°C, timp de 18 ore.

Soluție de clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu 1% în apă distilată.

Soluție de penicilază în apă distilată având concentrația de 1000 unități/ml.

Soluție de penicilină în apă distilată având conc. de 20 u.i./ml.

Lapte lipsit de penicilină.

Tehnica de lucru

În eprubete calibrate la 10 ml se pipetează 5 ml din proba de lapte ce servește pentru studiu. Se aduce la 10 ml cu lapte steril lipsit de penicilină. În jumătate din totalul eprubetelor se adaugă 0,2 ml soluție de penicilază. Apoi în fiecare eprubetă se adaugă 1 ml cultură de *Streptococcus thermophilus*. Se închid cu dopuri de cauciuc și se pun la incubat pe baie de apă la 44-45°C, timp de 90 de minute. Se introduce apoi în fiecare eprubetă 1 ml soluție de TTC. Se omogenizează bine. Se țin din nou pe baie de apă timp de 60 de minute.

Se pregătește și o probă martor, care conține 5 ml probă de lapte pentru cercetat, 5 ml lapte sterilizat lipsit de penicilină, 1 ml cultură de *Streptococcus thermophilus* și 1 ml soluție TTC, dar nu este pusă la incubat.

Se prepară, de asemenea, și un etalon de benzilpenicilină în lapte lipsit de penicilină, pornind de la o soluție apoasă de penicilină având concentrația de 20 u.i./ml. Diluțiile vor fi cuprinse între 2-0,01 u.i./ml. Ele servesc ca și punct de plecare pentru pregătirea amestecurilor de reacție. Acestea au aceeași compoziție cu cea descrisă mai sus cu excepția că, în loc de 5 ml lapte de cercetat se

folosesc 5 ml din diluția de penicilină. Tratamentul în continuare este identic cu cel de la seria experimentală. Rezultatele obținute la cele două serii se compară între ele și astfel se citește cantitatea de antibiotic din lapte.

13.4.2. Metoda rondelor

Principiul metodei. Rondele conținând cantități cunoscute de penicilină, respectiv rondelile conținând substanța de testat sunt așezate pe geloză simplă inoculată cu o tulpină foarte sensibilă de *Bacillus subtilis*. Interpretarea rezultatelor se face pe baza diametrelor zonelor de inhibiție.

Material necesar.

Diluțiile de antibiotic. Se prepară o soluție de benzilpenicilină de 100 u.i./ml în tampon fosfat la pH=6 (2 g K_2HPO_4 + 8 g KH_2PO_4 la 1 litru). Din această soluție se prepară apoi diluții conținând 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1 u.i./ml.

Mediul de cultură: geloză simplă.

Cultura bacteriană. Tulpina de *Bac. subtilis* utilizată se cultivă în prealabil pe geloză simplă la care s-a adăugat sulfat de mangan în proporție de 0,03%. Această substanță stimulează sporularea. Din cultura de 3-4 zile pe acest mediu se efectuează o suspensie în ser fiziologic. Se încălzește la 70°C, timp de 15 minute. Suspensia poate fi păstrată la frigider timp de 2 săptămâni.

Rondelile impregnate cu diluțiile de antibiotic și rondelile impregnate cu substanța de testat.

Tehnica de lucru

Tehnica de lucru este identică cu cea descrisă la metoda rondelor de la pag. 120.

13.5. Evaluarea în laborator a acțiunii dezinfectanților

A. Testul Rideal-Walker

În cazul acestui test, activitatea dezinfectanților este comparată cu aceea a fenolului ca și dezinfectant standard, fiind cunoscut și sub denumirea de coeficient fenolic. Testul Rideal-Walker este singurul test valid în compararea dezinfectanților similari ca și compoziție chimică cu fenolul și este mai puțin folosit în aprecierea eficienței dezinfectanților cum ar fi hipocloriții sau compuşii cuaternari de amoniu.

1. Metoda suspensiei celulare

(International Dairy Federation, 1962)

Această metodă este mult utilizată în industria alimentară și în industria laptelui în special. În principiu, această metodă constă în adăugarea unui număr cunoscut de microorganisme în suspensie la o soluție de dezinfectant de o anumită concentrație și apoi determinându-se numărul celor care au supraviețuit la un interval de timp dat. Metoda permite și studierea influenței substanțelor organice adăugate cum este de ex. laptele, asupra acțiunii dezinfectantului.

Materiale necesare

- *Culturi de Escherichia coli și Streptococcus lactis* crescute pe medii optime timp de 24 ore

- *Soluție Ringer*. se compune din

NaCl	.2,25 g
KCl	.0,105g
CaCl ₂	0,12 g
NaHCO ₃	0,05 g
Apă dist	1000 ml

Soluția se sterilizează la 121°C, 20 de minute.

- *Reactivi* - chimicale

- Na₂S₂O₃; CaCl₂.6H₂O; MgSO₄.7H₂O; Tween 80

- *Sticlărie*: eprubete, baloane, pipete gradate sterilizate în etuvă.

Tehnica de lucru

a. *Prepararea suspensiei celulare*. Culturi de *E.coli* sau *S. lactis* crescute pe medii solide se folosesc pentru recoltarea materialului biologic, în soluție Ringer. Soluția se agită pentru eliminarea agregatelor celulare. Se recomandă o concentrație de cca 10¹⁰ celule/ml (prin stabilirea densității optime, respectiv prin folosirea tuburilor Brown pentru opacitate (cu sticlă Pyrex).

Procedeeul testului. Se distribuie soluția de dezinfectant în concentrația necesară în cantitate de 99 ml într-un flacon conic de 250 ml. Concentrațiile testate vor trebui să includă și pe acelea care se aplică în practică. Se adaugă apoi 1 ml de suspensie celulară la soluția de dezinfectant. Se notează timpul cu precizie. Se agită bine. După o perioadă de contact de 0,5; 2; 5; 10 minute se ia 1 ml de amestec și se transferă într-un tub cu 9 ml soluție sterilă de inactivator. Se agită bine. Inactivatorul poate fi apropiat substanței test. Astfel, tiosulfatul de Na (0,5%) este folosit pentru testarea cu hipoclorit sau iodofori. Pentru compuși cu amoniu cuaternar se pot folosi următorii inactivatori:

1. un amestec de lecitină de ou 2% în o soluție apoasă 3% de Cirrasol ALN-WF sau
2. Tween 80 2%, respectiv
3. ser 10%

Compușii mercurici organici pot fi inactivați prin adăugarea de soluție de tioglicolat de Na 0,25%.

În continuare se determină numărul de microbi supraviețuitori pentru fiecare perioadă de expunere, scoțând din fiecare tub 1 ml, respectiv 0,1 ml, de la toate tuburile cu inactivatori, inoculând mediul nutritiv solid și incubându-l la temperatura optimă pentru fiecare microorganism.

2. Metoda testului de capacitate

Aceasta furnizează informații asupra capacității, de a utiliza soluții de dezinfectanți diluați pentru a fi singure cu microorganismele testate și cu substanța organică lipsită de activitatea dezinfectantului /Bergen și Lystad, 1971/.

Material necesar

- Culturi de *Pseudomonas fluorescens*, *E.coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Staphylococcus epidemidis*.

Prepararea diluțiilor de dezinfectanți. Se prepară 3 diluții din fiecare dezinfectant: 1.concentrația recomandată de firma producătoare; 2. 0,5 din concentrația folosită și 3. 1,5 din concentrația recomandată. Kelsey și Sykes /1969/ recomandă să se utilizeze pentru prepararea diluțiilor de dezinfectanți *apa tare standard* (aceasta se compune din : 17,5 ml soluție de CaCl_2 10% (g/v) și 5 ml soluție de MgSO_4 10% care se adaugă la 3,3 l apă distilată. Se sterilizează prin autoclavare).

Inactivatorii se vor încorpora în bulionul nutritiv în concentrațiile indicate. Vor exista 3 variante:

- a. inactivator + dezinfectant,
- b. inactivator + apă
- c. numai apă.

Se inoculează 10 ml din fiecare inactivator cu 1 ml suspensie conținând 10^3 - $5 \cdot 10^3$ microorganisme/ml. Imediat se ia 1 ml și se introduce într-o cutie Petri cu agar nutritiv. Se repetă această operație după 30 minute respectiv după 60 minute. Inactivatorul este corespunzător dacă determinările duc la obținerea de numere de microorganisme la cele 3 intervale de timp nesemnificative ca diferență.

Sticlărie: eprubete, baloane, pipete.

Tehnica de lucru

Din microorganismul testat se prepară o diluție sau o suspensie de cca 10^8 celule/ml, folosind un diluant anorganic. Se adaugă 1 ml de bulion nutritiv steril sau 1 ml de lapte diluat în proporție de 1:10. Se determină numărul de germeni din această diluție. Temperatura de determinare este 22°C , dar și alte temperaturi pot fi folosite.

Câte 6 ml din fiecare concentrație de dezinfectant sunt introduși într-un vas steril. La intervale de 10 minute, se adaugă 1 ml de suspensie bacteriană. Se agită. La 8 minute după fiecare adăugare de suspensie bacteriană, o probă este ridicată pentru a determina prezența sau absența germenilor viabili.

Câte 5 picături, a 0,02 ml, sunt adăugate pe suprafața agarului nutritiv dintr-o cutie Petri, respectiv câte o picătură din fiecare se adaugă în mediul cu inactivatori diferiți. Procedura este continuată pentru o oră, fiecare constând din 6 determinări de microorganisme cu concentrația dezinfectantului redusă la jumătate. Testul va stabili în final activitatea unui dezinfectant, aceasta fiind egală cu cel mai mare număr de determinări care au dat mai puțin decât 5 colonii de la 5 picături sau chiar mai puține decât două pozitive. Concentrația dezinfectantului, numărul de bacterii adăugate, concentrația substanței organice, pot fi calculate în final. În practică se poate folosi un dezinfectant dacă cel puțin 3 sau mai multe creșteri pot fi luate în seamă înainte ca o cultură pozitivă să fie obținută.

14. STUDIAREA BACTERIOFAGILOR

14.1. Izolarea bacteriofagilor

14.1.1. Izolarea din culturi lizogene

În acest caz bacteria lizogenă se cultivă în bulion de carne. Dacă se lucrează cu *Escherichia coli* se recomandă următorul mediu nutritiv (după Drews, 1968):

Bacto-triptoză	5 g
Proteoză-peptonă	5 g
Cazeină-peptonă	2 g
NH ₄ Cl	2 g
Glucoză	8 g
Citrat de Na	2 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
NaCl	2 g
Extract de drojdie	0,1 g
Apă distilată	1000 ml
pH = 7.	

Mediul se sterilizează la 105°C, 20 minute, în 3 zile consecutiv. *E.coli* se cultivă timp de 16 ore la 30°C, în mediul descris mai sus. Apoi bacteriile se îndepărtează fie prin centrifugare timp de 30 minute, la 3000 turații/minut, fie prin filtrare prin filtru Seitz. În cazul culturilor sporogene bacteriile se elimină prin filtrare sau prin tratare cu substanțe bactericide ca mertiolatul de Na în diluții de 1/5000 - 1/10.000.

14.1.2. Izolarea din apă de canal

Se iau 200 ml din apa de studiat și se introduc într-un balon de 1000 ml care conține 100 ml mediu nutritiv lichid (de obicei bulion de carne). Amestecul se însămânțează cu o bacterie sensibilă, nelizogenă, pentru care se caută bacteriofagul. După însămânțare amestecul se pune la incubat, la 37°C timp de 20-24 ore. Apoi bacteriofagii se separă prin filtrare, utilizând filtrul Seitz.

14.1.3. Izolarea din sol

Se adaugă 25 g sol într-un balon conținând 100 ml mediu nutritiv lichid (bulion de carne). Amestecul se însămânțează cu o suspensie densă din bacteria de studiat. Se incubează la 28°C, 48 de ore. Se filtrează apoi amestecul prin hârtie de filtru dublă pentru a

îndepărta particulele de sol și apoi prin filtru Seitz pentru a îndepărta celulele bacteriene.

14.1.4. Izolarea din materiile fecale

Se pune 1 g din materialul de cercetat în 20 ml bulion de carne. Amestecul se ține o oră la 37°C. Se centrifughează 20-30 minute la 2000-3000 rotații/minut sau se filtrează prin hârtie de filtru pentru a se îndepărta particulele mari din suspensie. Lichidul obținut se filtrează apoi prin filtrul Seitz. Filtratul trebuie să fie steril din punct de vedere bacteriologic.

14.2. Metode de punere în evidență a bacteriofagilor

Se cunosc mai multe metode de evidențiere a bacteriofagilor, dintre care cea mai larg utilizată este *însămânțarea în dublu strat de agar*.

Pentru aplicarea acestei metode se pregătesc două tipuri de medii nutritive solide: agar tare (geloză nutritivă 2%) și agar moale (geloză nutritivă 0,7%).

Drews recomandă următoarea compoziție pentru aceste două medii nutritive:

a) Mediul nutritiv cu agar tare:

Proteoză-peptonă	13 g
Cazeină-peptonă	6 g
NaCl	6 g
Citrat de Na	2 g
Glucoză	2 g
Bacto-agar Difco	15 g
Apă distilată	1000 ml
pH = 7 - 7,2	

b) Mediul nutritiv cu agar moale

Proteoză-peptonă	10 g
NaCl	6 g
Citrat de Na	2 g
Glucoză	3 g
Bacto-agar Difco	7 g
Apă distilată	1000 ml
pH = 7 - 7,2	

Mediul nutritiv cu agar tare se lichefiază pe baia de apă, se răcește la 45-50°C și se toarnă în cutii Petri sterile. Se lasă să se solidifice. Concomitent se pun pe baia de apă și eprubete ce conțin 2 ml mediu cu agar moale, pentru lichefierea acestuia. După ce mediul

cu agar moale s-a răcit la 45°C acesta se însămânțează cu 0,2 ml suspensie densă din cultura bacteriană de 24 ore (10^8 celule bacteriene/ml) și apoi se introduc 0,1 ml din filtratul în care se presupune existența bacteriofagului. Apoi conținutul fiecărei eprubete cu mediu se toarnă peste mediul cu agar tare în cutia Petri. Cutiile Petri se pun apoi la incubat la 37°C, pentru 24 ore. Dacă există bacteriofag în filtratul studiat, în cutii vor apărea zone de liză numite plaje de liză.

Pentru izolarea bacteriofagului în cultură pură, din aceste plaje de liză se fac transplantări cu ansa sterilă pe mediu lichid ce conține cultura bacteriană inițială, după 24 ore de incubare. Se incubează apoi la 37°C timp de 24 ore. Limpezirea mediului (inițial acesta fiind tulbure) înseamnă că s-a izolat bacteriofagul specific.

14.3. Titrarea bacteriofagilor

14.3.1. Titrarea prin metoda diluării bacteriofagului și a folosirii dublului strat de agar

Se prepară diluții seriate de bacteriofag pornindu-se de la materialul inițial ce se presupune a conține bacteriofagi și un lichid diluant (care poate fi bulion de carne steril, ser fiziologic sau o soluție tampon). Drews recomandă următoarea soluție tampon pentru diluarea bacteriofagilor:

K_2HPO_4	1,044 g
KH_2PO_4	0,544 g
NaCl	5 g
$MgCl_2$	0,2 g
$CaCl_2$	0,02 g
Apă distilată	1000 ml

După dizolvarea substanțelor, amestecul se sterilizează la 121°C, 30 de minute.

Se prepară diluții de la 10^{-1} - 10^{-5} . Din fiecare diluție se pipetează în tuburi de hemoliză câte 0,5 ml. Apoi din cultura bacteriei test de 24 ore se adaugă în toate tuburile câte 0,5 ml. În continuare în fiecare tub se introduce câte 1 ml mediu nutritiv cu agar moale lichefiat și răcit la 45-50°C. Amestecul din fiecare eprubetă se toarnă în câte o cutie Petri, numerotată conform diluțiilor, care conține deja un strat de mediu cu agar tare solidificat. Se lasă 24 ore la 37°C. Apoi se notează rezultatele. Se face numărarea plajelor de liză și pe baza diluției se stabilește numărul de bacteriofagi la 1 ml de filtrat. Schema din fig.25 redă mersul titrării bacteriofagilor conform

descrierii de mai sus. De asemenea, se notează diluția maximă activă, exprimându-se astfel titrul prin diluție.

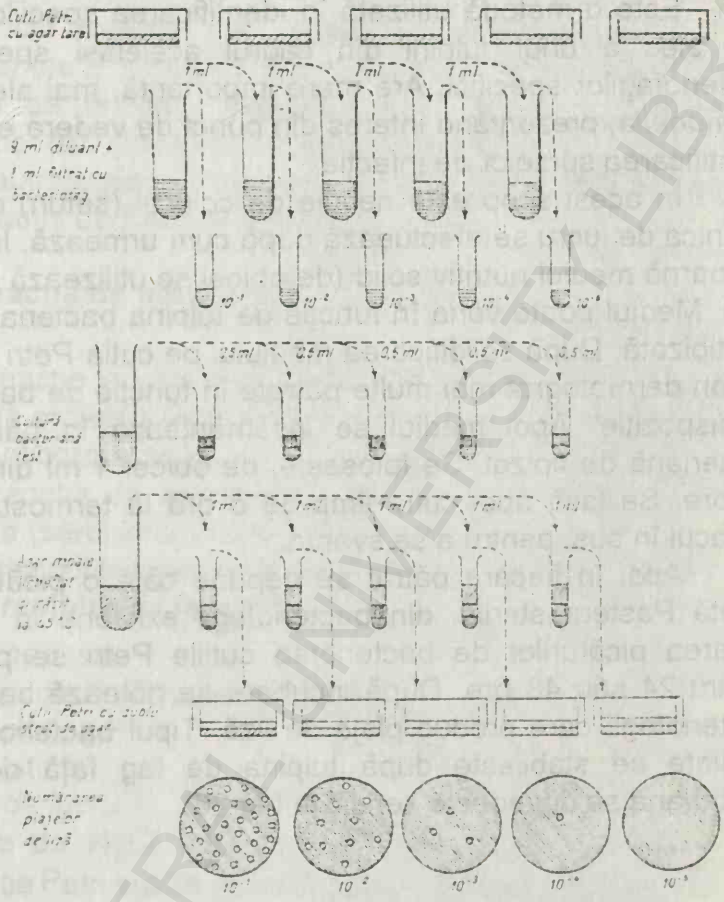


Fig.27. Schema titrării bacteriofagilor.

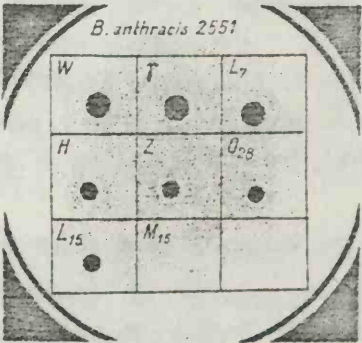


Fig.28. Tipizarea bacteriofagică.

14.4. Tipizarea bacteriofagică

Este o metodă utilizată în identificarea speciilor bacteriene și mai ales a unor tulpini din cadrul aceleiași specii cu ajutorul bacteriofagilor specifici. Are mare importanță, mai ales pentru genul *Salmonella*, prezentând interes din punct de vedere epidemiologic în identificarea surselor de infecție.

În acest scop este nevoie de colecții (seturi) de bacteriofagi. Tehnica de lucru se efectuează după cum urmează. Într-o cutie Petri se toarnă mediul nutritiv solid (de obicei se utilizează geloză nutritivă 2%). Mediul poate varia în funcție de tulpina bacteriană ce urmează a fi tipizată. După solidificarea mediului pe cutia Petri se trasează cu creion dermatograf mai multe pătrate în funcție de bacteriofagii avuți la dispoziție. Apoi mediul se însămânțează în pânză cu tulpina bacteriană de tipizat. Se folosește, de obicei 1 ml dintr-o cultură de 24 ore. Se lasă apoi cutia timp de o oră la termostat, la 37°C, cu capacul în sus, pentru a se svânta.

Apoi în fiecare pătrat se depune câte o picătură mică cu o pipetă Pasteur sterilă, din bacteriofagii existenți în colecție. După uscarea picăturilor de bacteriofag cutiile Petri se pun la incubat, pentru 24 sau 48 ore. După incubare se notează bacteriofagul sau bacteriofagii care produc plaje de liză. Tipul bacteriofagic al tulpinii studiate se stabilește după tulpina de fag față de care tulpina bacteriană se dovedește sensibilă (fig.26).

15. REACȚIILE SEROLOGICE (ANTIGEN-ANTICORP)

Sunt reacții specifice. Se desfășoară *in vitro* sau și *in vivo*. Participă antigenele și anticorpul. În funcție de modul cum acționează anticorpul față de antigen, deosebim mai multe reacții antigen-anticorp: reacția de precipitare, reacția de aglutinare, reacția de floculare și neutralizare a toxinelor, reacția de liză (bacterioliză, hemoliză) și reacția de fixare a complementului.

15.1. Reacția de precipitare

Este o reacție *in vitro*. Antigenul se numește *precipitinogen* și este o soluție de proteine (ser, extract din țesuturi și organe, proteine izolate etc.). Anticorpul se numește *precipitină*. În acest caz, spre deosebire de reacția de aglutinare, precipitinogenul se diluează în serie, precipitina (serul imun) nu se diluează.

Precipitarea poate fi executată în gel, pe lame sau în eprubete.

15.1.1. Precipitarea în gel

Material necesar

- Soluție de NaCl izotonică 0,85%
- Precipitinogen
- Precipitină

Tehnica de lucru

O soluție de NaCl izotonică se solidifică cu agar-agar. Se toarnă într-o cutie Petri sterilă. Pe suprafața solidă se fac găuri sau se introduc cilindri de sticlă sau bucăți de hârtie, în unele găuri se pune soluția de precipitinogen, iar în altele soluția de precipitină. Prin difuzie acestea migrează și la linia lor de întâlnire reacționează specific, producând benzi albe de precipitat.

Reacția de precipitare are diferite aplicații: 1. în medicina legală, pentru diferențierea proteinelor de origine umană sau animală, 2. în controlul alimentelor (câminuri) și 3. ca metodă de diagnostic în bolile infecțioase.

15.1.2. Aplicații în medicina legală. Reacția Uhlenhuth.

Cu ajutorul acestei reacții se poate preciza dacă o pată de sânge proaspătă sau veche (uscătă) găsită pe haine este de origine umană sau animală.

Elementele reacției sunt următoarele:

1. seruri precipitante anti-om sau anti-animale;
2. fragmente de stofă sau țesătură cu pata de examinat și
3. soluție de NaCl izotonică 0,85%.

Serurile precipitante se obțin prin inocularea repetată la iepure a serului de om, respectiv a serurilor unor animale. În cazul serului precipitant anti-om se inoculează la iepure intravenos un amestec de 5-6 seruri umane în cantitate de 4 ml. Se repetă inoculările de 3-4 ori la intervale de 5 zile, cu aceeași cantitate de ser. Animalele sunt sângerate a opta zi de la ultima inoculare (făcându-se în prealabil un control pentru titrul precipitinelor). Sunt folosite numai serurile cu titrul ridicat, care precipită serul de om în diluție de cel puțin 1:10.000. Serurile se înfiolează și se păstrează la rece.

Serurile precipitante ale celorlalte animale se prepară în mod similar.

Tehnica de lucru

Se va lucra cu mai multe feluri de seruri precipitante:

- ser precipitant anti-om (titru 1:20.000)
- ser precipitant anti-bou (titru 1:20.000)
- ser precipitant anti-câine (titru 1:15.000)
- ser precipitant anti-pasăre (titru 1:10.000)
- ser precipitant anti-cal (titru 1:10.000)
- ser precipitant anti-porc (titru 1:10.000)

La pata de sânge suspectă de pe fragmentul de stofă sau țesătură se adaugă câțiva ml de soluție de NaCl izotonică. Se filtrează, iar lichidul clar obținut servește drept antigen. Se pipetează în tuburi de hemoliză câte 0,5 ml din fiecare ser precipitant. Apoi se adaugă 0,5 ml din filtratul clar. Adăugarea se face cu mare grijă, tubul trebuie ținut înclinat, iar prelingerea antigenului să se facă foarte încet ca să nu se amestece cu serul precipitant. Se îndreaptă apoi eprubeta și se pune în poziție verticală în stativ. Tuburile se mențin 30 de minute la 37°C. Apoi se citește rezultatele. Dacă se produce la suprafața de contact a celor două lichide un inel tulbure reacția este pozitivă. Intensitatea reacției se evaluează după mărimea inelului și după timpul scurs până la apariția lui. Se prepară și probe martor care conțin soluție izotonică de NaCl și filtratul clar conținând antigenul de studiat.

Dacă s-a produs precipitarea în tuburile conținând ser precipitant anti-om reacția este considerată pozitivă, pata de sânge fiind de origine umană. În cazul când nu s-a produs precipitarea, se utilizează celelalte seruri precipitante.

Reacția de precipitare se caracterizează printr-o extraordinară sensibilitate și specificitate. Ea permite descoperirea urmelor minime de antigen proteic, în general până la diluții de 1:10.000 sau și mai mari.

15.1.3. Aplicația reacției de precipitare în controlul alimentelor

Serurile precipitante fiind dotate cu o mare specificitate sunt utilizate, în vederea diferențierii originii cărnii date în comerț. Se poate diferenția astfel carnea de oaie, de carnea de cal, porc, vită etc., indiferent dacă produsul este proaspăt sau conservat.

Tehnica de lucru

Din produsul de carne de examinat se face un extract apos, care reprezintă precipitinogenul. Acesta se repartizează în tuburi de hemoliză (0,5 ml/tub). Se adaugă apoi serurile precipitante (0,5 ml ser precipitant pentru fiecare tub), respectându-se aceleași condiții descrise mai înainte. Se prepară și amestecuri de reacție martor care conțin numai extract apos+soluție izotonică de NaCl. În cazul unei reacții pozitive, se poate preciza originea cărnii conform serului precipitant utilizat.

15.1.4. Reacția de precipitare ca metodă de diagnostic în bolile infecțioase

În practica medicală această reacție are o întrebuințare mai redusă. Ea se utilizează în două scopuri: 1. pentru a cerceta puterea precipitantă a serului uman sau animal față de filtratele de cultură microbiană corespunzătoare și 2. pentru punerea în evidență, a precipitinogenului din diferite extracte de organe, lichid, cefalorahidian, urină etc., în prezența serurilor precipitante imune, atunci când nu poate fi izolat agentul cauzal al bolii.

Amintim următoarele reacții de precipitare: reacția Kahn (pentru diagnosticul sifilisului), reacția Ascoli (pentru diagnosticul infecției carbunoase) și reacția Vincent-Bellot (pentru diagnosticul meningitei cerebrospinale cu meningococ). Dintre acestea descriem reacția Kahn.

15.1.4.1. Reacția Kahn

Pentru a avea mai mare siguranță în diagnosticul serologic al sifilisului, în mod obișnuit, alături de reacția Bordet-Wassermann (RBW) se fac și un număr de 2-3 reacții de precipitare, prin care se observă în mod direct reacția dintre antigen (haptенă) și anticorp. Se utilizează mai mult pentru depistarea sifilisului latent, a celui ereditar, precum și la bolnavii în tratament. reacțiile de precipitare sunt mai sensibile decât cele de fixare a complementului, dar sunt mai puțin

specifice. Dintre reacțiile de precipitare, reacția Kahn este cea mai sensibilă.

Material necesar

- Antigen (precipitinogen) Kahn (extract eteric colesterinat de inimă de bou)
- Ser de cercetat, inactivat (inactivarea se face timp de 30 minute, pe baia de apă la 56°C)
- Soluție de NaCl izotonică

Tehnica de lucru

Se face diluarea antigenului Kahn conform indicațiilor preparatului. Diluarea se execută cu o cantitate fixă de soluție NaCl izotonică. de obicei diluția este de 1:1. Amestecul se realizează într-o eprubetă. Acesta se lasă în repaus 10 minute. În cazul fiecărui ser de cercetat se întrebuintează 3 tuburi de hemoliză. În primul tub de hemoliză se pipetează cu ajutorul unei micropipete 0,05 ml, în tubul al doilea 0,025 ml, iar în tubul al treilea 0,0125 ml din diluția de antigen. Apoi în fiecare tub se adaugă câte 0,15 ml ser inactivat. Se agită timp de 3 minute. Înainte de agitare, eprubetele pot fi puse pentru 10 minute la termostat, la 37°C, fără a fi obligatorie această operație. Se adaugă apoi în primul tub 1 ml de soluție NaCl izotonică, iar în tubul 2 și 3 câte 0,5 ml soluție NaCl izotonică. Se agită din nou și se așează tuburile la aglutinoscop sau se citesc rezultatele cu ajutorul lupei. Schema preparării amestecurilor pentru reacția Kahn este redată în tabelul 6.

Tabelul 6

Schema preparării amestecurilor pentru reacția Kahn

Nr. tubului	Antigen Kahn diluat (ml)	Ser de examinat inactivat (ml)	Sol. NaCl izotonică (ml)
1	0,05	0,15	1
2	0,025	0,15	0,5
3	0,0125	0,15	0,5

Rezultatele se notează astfel:

++++ = reacție intens pozitivă; precipitare intensă, lichid supernatant clar

+++ = reacție pozitivă; precipitare mijlocie

++ = reacție slab pozitivă; precipitare slabă

++ = rezultat suspect; precipitat abia perceptibil

- = rezultat negativ; lipsa precipitării, lichid supernatant tulbure.

Este indicat ca la fiecare serie, de reacții să se folosească și un maror sigur pozitiv și unul sigur negativ.

15.2. Reacția de aglutinare

Este o reacție antigen-anticorp *in vitro*. Antigenul se numește aglutinogen și este reprezentat de o suspensie de celule. Anticorpul se numește aglutinină. Aglutinarea se manifestă prin aceea că celulele se agregă sub formă de granule sau flocoane, care sedimentează (are loc o îngrămădire a microbilor sub formă de conglomerate). Aglutininele apar în sângele omului sau al animalelor în cursul bolilor infecțioase sau în urma inoculărilor repetate cu microbi dintr-o anumită specie (vaccinare).

Aglutinarea se petrece în 2 faze. Într-o primă fază are loc formarea complexului antigen-anticorp, iar în faza a doua are loc aglomerarea bacteriilor sensibilizate, constituind aglutinarea propriu-zisă. Aglutinarea este influențată de pH și temperatură. La pH prea acid sau prea alcalin se produce fie aglutinarea spontană, fie inhibarea aglutinării. Temperatura scăzută diminuează viteza reacției iar cea ridicată (peste 56°C) face ca reacția să nu mai fie specifică, din cauza denaturării aglutininelor. Optimumul de temperatură este între 37 și 52°C , în funcție de natura aglutinogenului.

Această reacție este folosită în diagnosticul multor boli infecțioase în vederea evidențierii aglutininelor specifice din serul unui bolnav, față de unul sau mai mulți agenți patogeni sau cunoscuți sau pentru a identifica un germeni insuficient determinat prin alte metode.

Elementele reacției sunt următoarele: serul de cercetat (sau seruri aglutinante); antigenul și soluția cloruro-sodică izotonică 0,85%.

Serul de cercetat. Dat fiind că aglutininele apar în sânge după 7-10 zile de la pătrunderea aglutinogenului, sângele se recoltează de această dată (prin puncție venoasă sau prin înțeparea pulpei degetului). Se separă serul de hematii. Nu se vor folosi seruri hemolitice sau infectate care dau reacții fals pozitive. Se poate lucra și cu seruri aglutinante. Acestea se obțin prin inocularea repetată la iepuri a antigenelor microbiene, pentru care vrem să preparăm serul aglutinant. Serul aglutinant poate fi polivalent (să conțină aglutinine pentru mai multe tulpini) sau monovalent (conține aglutinine pentru o singură tulpină). de ex. serul aglutinant polivalent anti-*Escherichia coli* provine de la iepurii imunizați activ față de 10 tipuri de *E. coli* întâlnite mai frecvent în enteritele infantile. El conține aglutinine care corespund tuturor fracțiunilor antigenice ale celor 10 tipuri, și anume:

- ser aglutinant anticoli	O ₁₁₁ B ₄
- ser aglutinant anticoli	O ₅₅ B ₅
- ser aglutinant anticoli	O ₂₆ B ₆
- ser aglutinant anticoli	O ₈₆ B ₇
- ser aglutinant anticoli	O ₁₁₉ B ₁₄
- ser aglutinant anticoli	O ₁₂₅ B ₁₅
- ser aglutinant anticoli	O ₁₂₆ B ₁₆
- ser aglutinant anticoli	O ₁₂₇ B ₈
- ser aglutinant anticoli	O ₁₂₈ B ₁₂
- ser aglutinant anticoli	O ₁₂₄ B ₁₇

Antigenul. Prepararea suspensiei microbiene.

Se vor întrebuința tulpini de germeni cunoscuți, care nu sunt aglutinabili spontan (colonii S). Culturile trebuie să fie proaspete, de 24 ore, însămânțate în pânză pe geloză înclinată. Suspensia microbiană se prepară astfel: se raclează cultura de pe geloză cu ajutorul ansei de platină sau cu o pipetă Pasteur închisă la vârf și se emulsionează într-un tub cu soluție de clorură de sodiu 0,85%.

Va trebui ca suspensia să fie omogenă, în acest scop ansa se va descărca prin frecare de pereții tubului. Suspensia obținută trebuie să aibă o anumită opacitate. Ea este bună când, pusă într-o eprubetă de 18 mm diametru și așezată în fața unui ziar, ne putem da seama de caracterele normale ale literelor. Pentru controlul opacității se mai folosesc și etaloane standard de diferite opacități, corespunzătoare pentru fiecare germen în parte, la o anumită concentrație de germeni/ml. Etaloanele standard se prepară în general din H₂SO₄ N/5 și BaCl₂ 0,09662%. Ca antigen se pot întrebuința și suspensii microbiene omorâte (prin formol, alcool, fenol etc.).

Soluția de clorură de sodiu izotonică folosită în reacție este o soluție de NaCl p.a. în apă distilată, în proporție de 8,5 g la 1000 ml apă distilată.

Reacția de aglutinare se execută în tuburi sau pe lame.

15.2.1. Reacția de aglutinare în tuburi

Se va lucra cu 6 tuburi de hemoliză, notate de la 1 la 6. Se repartizează câte 0,5 ml soluție de clorură de sodiu izotonică în tuburile 2,3,4,5 și 6. Într-un tub aparte se face diluția inițială a serului de cercetat 1/10 (1 ml ser + 9 ml soluție de clorură de sodiu izotonică). Din această diluție de ser se vor repartiza câte 0,5 ml în tuburile 1 și 2. Din tubul 2 se va lua 0,5 ml amestec și se va trece în tubul 3. Se repetă această operație pentru tubul 4 și apoi pentru tubul 5. Tubul ultim nu conține ser de cercetat și servește drept martor.

Se adaugă apoi în toate tuburile de reacție câte 0,5 ml antigen (cantitatea de amestec în toate tuburile fiind final de 1 ml). În tubul martor (6) se vor găsi numai soluția de NaCl și antigenul. Acesta se folosește pentru controlul antigenului, care uneori dă aglutinări spontane ce falsifică rezultatul.

Schema pregătirii amestecurilor pentru reacția de aglutinare este redată în tabelul 7.

Tabelul 7

Repartizarea amestecurilor pentru reacția de aglutinare

Materialul adăugat	Numărul tubului					
	1	2	3	4	5	6
Soluție de NaCl 0.85% (ml)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser de cercetat diluat 1/10 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	se aruncă 0,5 ml
Antigen (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Diluțiile finale de ser	1/20	1/40	1/80	1/60	1/320	-

După repartizarea suspensiei microbiene, tuburile se agită și se pun la termostat, la 37°C.

Citirea reacției se face prin două procedee.

Procedeul microscopic. După 10-20 minute de menținere a tuburilor la 37°C, se examinează amestecul între lamă și lamelă la microscop. Dacă a avut loc aglutinarea, microbii își pierd mobilitatea (cei care prezintă mobilitate) și se adună în mici grămezi, care ulterior se unesc formând mase tari.

Procedeul macroscopic. Tuburile se țin la 37°C sau la 52°C, timp de 2 ore, după care sunt scoase și lăsate la temperatura camerei 24 de ore. În acest interval se formează aglutinate ce cad la fundul tuburilor. O primă citire în acest caz se face după 2 ore, apoi după 24 de ore. În tuburile cu reacție pozitivă se observă un depozit, iar lichidul de deasupra este clar. În tuburile cu reacție negativă, precum și în tubul martor, suspensia rămâne opalescentă. Înainte de a fi examinate, tuburile se agită ușor. Pozitivitatea reacției se notează în felul următor:

++++ = pentru o aglutinare completă, lichid clar;

+++ = lichid clar sau aproape clar, depozit însemnat;

++ = lichid neclar, depozit mic;

+ = lichid neclar, depozit neînsemnat;

± = reacție îndoielnică;

- = absența depozitului, suspensie omogen tulbure.

Pentru majoritatea reacțiilor de aglutinare folosite în scop de serodiagnostic, titrul variază între 1/100 - 1/200. Sub valoarea 1/100 titrurile nu sunt semnificative. Diluția maximă a serului la care se mai observă fenomenul de aglutinare se numește titrul serului. Titrul aglutinant este variabil, pentru stabilirea unui diagnostic.

15.2.2. Reacția de aglutinare pe lame

Se execută pe lame de sticlă bine degresate. Se pune o picătură din diluția de ser polivalent anticoli. Apoi se adaugă o picătură din suspensia de aglutinogen (culturi lactozo-pozitive de cercetat). Drept martor va servi o suspensie de aglutinogen + soluție izotonică de NaCl 0,85%. Dacă se observă după 1-2 minute fenomenul de aglutinare, reacția este pozitivă. Se trece apoi la reacția în tuburi, folosind ser monovalent anticoli.

15.3. Reacția de fixare a complementului

Este o reacție antigen-anticorp în care intervine și un al treilea element numit complement sau alexină. Complementul este un complex de proteine, termolabil, care se distruge în 30 minute la 56°C. Se găsește în serul proaspăt al tuturor animalelor normale. Serul de cobai conține foarte mult complement. Tehnica reacției de fixare a complementului comportă doi timpi. Într-un prim timp are loc formarea complexului antigen-anticorp care fixează complementul. Acest fenomen nefiind evidențiable, se introduce un al 2-lea timp, folosindu-se un sistem indicator (hemolitic). Din această categorie face parte și reacția Bordet-Wassermann.

15.3.1. Reacția Bordet-Wassermann

Elementele reacției sunt antigenul, serul de cercetat, complementul, hematii de berbec, serul hemolitic și soluția de NaCl izotonică 0,85%.

Antigenul. Este numit și antigenul Bordet-Ruelens. Acesta este un extract alcoolic din inimă de vițel după epuizarea prealabilă prin extracție cu acetonă (este o suspensie coloidală de lipoizi solubili în alcool și insolubili în acetonă).

Serul de cercetat. Înainte de efectuarea reacției serul va fi centrifugat la nevoie, apoi inactivat pentru a-i distruge complementul propriu (30 minute la 56°C, pe baie de apă).

Complementul. Se folosește ser de cobai care furnizează un complement foarte activ, relativ fix. Se recomandă folosirea unui amestec de seruri de la cel puțin 3 cobai (masculi), ținuti nemâncăți timp de o zi. Animalele se vor sângera prin puncția cordului, de la fiecare recoltându-se 5-10 ml sânge. Această operație se face cu 18-20 ore înaintea întrebuițării.

Hematiile de berbec. În ziua reacției se recoltează steril sânge de berbec, se defibrinează și se spală cu o soluție de NaCl izotonică, prin 3-4 centrifugări repetate. Ultima soluție de spălare se îndepărtează în întregime și se păstrează numai depozitul de hematii. Acestea se pot conserva în lichidul Alsever, care are următoarea compoziție:

Glucoză	18,66 g
Citrat trisodic	6,99 g
NaCl	4,18 g
Apă distilată	1000 ml

Soluția se sterilizează prin filtrare sau prin tindalizare, 30 de minute la 100°C, în trei zile consecutive.

Serul hemolitic. Se utilizează ser hemolitic anti-hematii de berbec, preparat pe iepure. Prepararea serului hemolitic se face prin inocularea hematiilor de berbec la iepure (în vena marginală a urechii). Se fac 3 inoculări repetate la intervale de 4 zile, cu 5 ml, 3 ml și 1 ml hematii sterile. După 8 zile de la ultima inoculare se practică sângerea (după ce în prealabil se determină titrul serului hemolitic respectiv). Sângerea se face în mod steril, fie din carotidă (sângereare la alb), fie prin puncție cardiacă. După coagularea sângelui, se decantează serul, se centrifughează (pentru îndepărta rea restului de hematii) și se repartizează în fiole.

Prepararea sistemului hemolitic.

Aceasta se prepară din 3 ml globule roșii + 4 ml ser hemolitic + 193 ml soluție izotonică de NaCl 0,85%. Elementele cuplului hemolitic sunt bine amestecate într-un balon Erlenmeyer și menținute la termostat 30 de minute înainte de întrebuițare, pentru a se produce sensibilizarea globulelor roșii.

Titrarea elementelor reacției. Pentru ca reacția de fixare a complementului să aibă loc, elementele care iau parte trebuie să se găsească într-o anumită proporție unele față de altele. Titrare elementelor permite stabilirea dozelor optime pentru fiecare element.

Titrare antigenului. Se titrează puterea anticomplementară și valoarea antigenică.

Determinarea puterii anticomplementare a antigenului. Antigenele pot, în anumite proporții, să fixeze nespecific o cantitate de complement chiar în lipsa anticorpului specific. Aceasta reprezintă puterea anticomplementară a antigenului și determinarea ei constă în stabilirea cantității maxime de antigen care, în absența anticorpilor specifici, nu fixează complementul.

Tehnica reacției. Se pipetează cantități crescând din suspensia antigenică de titrat, începând cu 0,1 ml până la 1 ml, în tuburi de hemoliză. Apoi se adaugă aceleași cantități de complement diluat 1/10, reprezentând cantitatea imediat superioară titrului de complement determinat de noi. Se completează cu soluție de NaCl izotonică 0,85% până la volumul total de 1,5 ml/tub. Tuburile se țin apoi la termostat, la 37°C, timp de 60 minute. Se scot tuburile de la termostat și se introduce în fiecare 1 ml de sistem hemolitic. Din nou se pun la termostat (37°C) pentru 30 de minute. Se face o primă citire imediat după ce se scot de la incubat, iar a doua citire după 1-22 ore de păstrare la +4°C - +6°C. Titrul puterii anticomplementare este dat de prima eprubetă în care s-a produs hemoliza totală. Dacă de ex. 0,4 ml de antigen reprezintă cantitatea maximă de antigen care nu a împiedicat hemoliza, aceasta denotă că 0,4 ml este cantitatea maximă de antigen lipsită de putere anticomplementară. Peste această doză antigenul fixează nespecific alexina. Drept consecință, în reacția de fixare a complementului se vor utiliza numai cantități de antigen sub 0,4 ml. Dacă în reacția de titrare toate cantitățile de antigen fixează alexina, neavând hemoliză totală în nici un tub, reacția se va repeta diluând antigenul în proporție de 1/2, 1/3 etc. Schema acestei titrări este redată în tabelul 8.

Tabelul 8

Compoziția amestecurilor de reacție pentru determinarea puterii anticomplementare a antigenului

Materialul adăugat	Numărul tubului								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Suspensie de antigen (ml)	1	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-	-
Complement (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Soluția de NaCl izotonică 0,85%	-	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,5
Sistem hemolitic (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Titrare valorii antigenice. Valoarea antigenică este cantitatea minimă de antigen care în prezența anticorpilor specifici fixează complementul. Titarea valorii antigenice se face prin comparație cu un ser imun, specific antigenului, cu un conținut cunoscut de anticorpi. Valoarea antigenului va fi cu atât mai ridicată, cu cât va permite decelarea unei cantități mai mari de anticorp în serul de cercetat.

Tehnica determinării valorii antigenice. Se repartizează, în tuburi de hemoliză, cantități descrescânde din diluția de antigen. Se adaugă în fiecare tub o cantitate constantă de ser specific cunoscut, cantitatea de complement determinată și soluție de NaCl izotonică 0,85%. Schema preparării amestecurilor este redată în tabelul 9.

Se menține pentru sensibilizare 60 de minute la 37°C, apoi se adaugă 1 ml sistem hemolitic. Se ține din nou la termostat la 37°C pentru 30 minute, după care se face citirea reacției. Titulul reacției este dat de ultimul tub în care nu s-a produs hemoliza, deci nu a fost fixat complementul. Prima citire se face imediat după ce tuburile se scot de la incubat și a doua după 18-22 ore de păstrare la +4°C. Cantitatea de antigen de întrebuințat în reacție este cantitatea dublă sau un multiplu al cantității minime de antigen care a permis o fixare completă. Această cantitate este indicată pe fiecare flacon.

Tabelul 9

Schema titrării valorii antigenice

Materialul adăugat	Numărul tubului								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Antigen diluat 1/10	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	-	-	-
Ser pozitiv (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Complement (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-
Soluție de NaCl izotonică 0,85% (ml)	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,45	0,5	1	1,5
Sistem hemolitic (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Titrare complementului. Înainte de întrebuințare, complementul (serul de cobai) trebuie întotdeauna titrat. Pentru aceasta, serul de cobai se diluează cu o soluție izotonică de NaCl 0,85% în proporție de 1:10. Apoi se pipetează în 8 tuburi de hemoliză cantități

crescând de complement diluat, începând cu 0,05 ml și măbind cu aceeași cantitate până la 0,4 ml. Tubul 9 nu conține complement, reprezentând proba martor. Se completează apoi cu soluție izotonică de NaCl până la 1,5 ml. În tubul 9 vom avea numai 1,5 ml soluție izotonică de NaCl. În continuare, în toate tuburile se adaugă 1 ml sistem hemolitic. Se agită bine și se pun la termostat, la 37°C, pentru 15 minute. Titrul complementului este indicat de tubul care conține cantitatea cea mai mică de complement în care s-a produs o hemoliză totală. În reacția serologică se va folosi titrul imediat următor. Așa de exemplu, dacă titrul a fost de 0,2 ml complement diluat, atunci în reacție se va folosi 0,25 ml complement diluat, Prepararea amestecurilor utilizate pentru titrarea complementului este redată schematic în tabelul 10.

Tabelul 10

Schema titrării complementului

Material adăugat	Numărul tubului								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Complement diluat 1/10 (ml)	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	-
Soluție NaCl izotonică (ml)	1,45	1,40	1,35	1,30	1,25	1,20	1,15	1,10	1,5
Sistem hemolitic	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tehnica reacției Bordet-Wassermann

În reacție se utilizează 8 tuburi. Tubul 1 și 2 reprezintă tuburile reacției propriu-zise. Tubul 3 reprezintă martorul pentru puterea anticomplementară a serului de cercetat. Tubul 4 reprezintă martorul sigur negativ, tubul 5 - martorul sigur pozitiv, tubul 6 - martorul pentru puterea anticomplementară a antigenului, tubul 7 - controlul alexinei și al sistemului hemolitic, iar tubul 8 - martorul pentru hematiile de berbec și soluția de NaCl izotonică. Redăm modul de preparare a acestor amestecuri în tabelul 11. Notarea intensității reacției BW se face în felul următor:

- ++++ = absența totală a hemolizei, sediment de hematii, supernatant incolor;
- +++ = absența hemolizei, sediment de hematii, supernatant roz;
- ++ = hemoliză intensă, sediment mic de hematii, supernatant colorat roz;
- + = hemoliză intensă, urme de sediment de hematii, supernatant intens colorat;
- ± = reacție îndoielnică, ușoară hemoliză, fără sediment;

Tabelul 11

Schema reacției Bordet-Wassermann

Material adăugat	Numărul tubului							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Antigen diluat 1/20 (ml)	0,2	0,2	-	0,2	0,2	0,4	-	-
Ser de cercetat (suspect) (ml)	0,1	0,2	0,3	-	-	-	-	-
Ser normal (negativ) (ml)	-	-	-	0,2	-	-	-	-
Ser sigur pozitiv (ml)	-	-	-	0,2	-	-	-	-
Complement diluat 1/10 (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-
Soluție NaCl izotonică 0,85% (ml)	0,9	0,8	0,9	0,8	0,8	0,8	1,2	1,5
	Tuburile se agită bine și se pun la termostat la 37°C, timp de 60 minute							
Sistem hemolitic (ml)	1	1	1	1	1	1	1	
	Se agită din nou și se pun la termostat (37°C) pentru 30 minute							
Rezultat pozitiv	-	-	liză	liză	-	liză	liză	-
Rezultat negativ	liză	liză	liză	liză	-	liză	liză	-

15.4. Determinarea indicelui opsonocitofagic

Opsoninele sunt proteine serice care pregătesc celulele microbiene în vederea fagocitării lor. Opsoninele pot fi: nespecifice (se găsesc în serul normal) și specifice (bacteriotropine; se găsesc în

serul imun și apar în urma stimulului unui antigen, asupra căruia acționează specific).

S-a constatat că activitatea fagocitară a micro- și macrofagelor este intensificată într-un ser prelevat de la un animal imunizat. Opsonina se fixează pe antigenul specific, respectiv pe celula microbiană și o modifică, așa încât devine mult mai ușor fagocitabilă de către leucocite.

Reacția opsonocitofagică se utilizează în diagnosticul tusei convulsive și al tuberculozei și poate servi la aprecierea evoluției unei infecții (prognostic).

Constă în amestecarea microbilor cu un ser imun, apoi examinarea la microscop după colorație și stabilirea proporției de germeni ingerați de fagocite.

Indicele opsonic reprezintă raportul dintre activitatea fagocitară a leucocitelor normale față de agentul patogen care a provocat infecția, în prezența serului de bolnav, comparativ cu un ser normal.

Se folosesc: suspensia de leucocite, preparate din sânge uman sau din exsudat peritoneal de la cobai; ser de cercetat; ser normal (martor) și suspensie microbiană din germele față de care se determină puterea opsonizantă.

Prepararea leucocitelor. În cazul folosirii leucocitelor din sângele uman se recoltează într-un tub de centrifugă circa 20 picături de sânge prin înțeparea feței dorsale a unui deget. Se amestecă sângele recoltat cu o soluție anticoagulantă, în proporție de 8-10 ori părți soluție anticoagulantă și o parte sânge. Soluția anticoagulantă este alcătuită din:

NaCl	8,5 g
Citrat de Na	15 g
Apă distilată	1000 ml

Amestecul de sânge și soluție anticoagulantă se centrifughează, se îndepărtează supernatantul, iar depozitul se spală de 3 ori prin centrifugare cu câte 10 ml soluție de NaCl 0,85%. Se îndepărtează lichidul de spălare. Depozitul rămas va prezenta un strat superficial, format din leucocite și un strat profund, format din globule roșii. Se înclină tubul și se aspiră leucocitele cu o pipetă Pasteur sterilă cu deschiderea mai largă. Acestea se depun într-un tub de hemoliză.

Pentru recoltarea leucocitelor de cobai, se provoacă la acesta un exsudat peritoneal prin inocularea intraperitoneală a 30 ml bulion steril. După 1-2 ore se puncționează peritoneul cobaiului și se recoltează exsudatul bogat în leucocite. Și aici recoltarea se face în soluție anticoagulantă și leucocitele astfel obținute sunt spălate cu soluție izotonică de NaCl prin centrifugări (5-10 ori).

Serul de cercetat. Se recoltează sânge din pulpa degetului într-o pipetă îndoită. Se lasă la termostat 2-3 ore pentru separarea cheagului de ser. Apoi tubul se secționează și se recoltează serul clar. Serul se poate păstra la frigider, 3-4 zile.

Serul normal (martor) se recoltează de la un individ sănătos, folosind aceeași tehnică.

Suspensia microbiană. Se prepară dintr-o cultură de 18-24 ore în ser fiziologic.

Tehnica de lucru

Se amestecă, în cantități egale, serul, suspensia de germeni și leucocitele. Se lasă 30 de minute la termostat. Din acest amestec se execută frotiuri pe lame curate și degresate (se aplică aceeași tehnică ca și la frotiul executat din sânge). Se fixează cu alcool absolut. Se colorează cu albastru de toluidină sau soluție Giemsa. În cazul lui *Mycobacterium tuberculosis* se face o colorație Ziehl-Neelsen (încălzirea efectuându-se la 37°C).

Se procedează în mod identic și cu serul martor (serul normal).

Citirea rezultatelor

Se examinează 100 de leucocite polimorfonucleare și se notează numărul de microbi conținuți în fiecare din ele, notându-se cu 0 (zero) leucocitul care nu a fagocitat nimic. Notarea se face numai pentru leucocitele bine colorate și distincte. În cazul unei fagocitări intense când microbii sunt în număr prea mare și nu pot fi numărați, se va înscrie întotdeauna cifra 9. Puterea opsonică (indicele fagocitar) se obține prin împărțirea numărului de microbi găsiți în 100 de polimorfonucleare la 100.

$$\text{Puterea opsonică (indicele fagocitar)} = \frac{\text{Numărul microbilor găsiți în 100}}{100} \quad \text{polimorfo-nucleare}$$

De ex., dacă în 100 leucocite polimorfonucleare s-au găsit 200

microbi, atunci puterea opsonică a serului va fi $\frac{200}{100} = 2$.

Indicele opsonocitofagic se determină pe baza raportului dintre puterea opsonică a serului de cercetat și puterea opsonică a serului normal (martor).

$$\text{Indicele opsonocitofagic} = \frac{\text{Puterea opsonică a serului cercetat}}{\text{Puterea opsonică a serului normal}}$$

Dăm un exemplu: dacă serul de cercetat are puterea opsonică 4, iar serul normal 2, indicele opsonocitofagic va fi $\frac{4}{2}$, adică 2. Orice creștere a indicelui opsonocitofagic peste 1 indică o creștere a titrului opsoninelor din serul de cercetat..

16.METODE UTILIZATE ÎN MICROBIOLOGIA SOLULUI

16.1. Descompunerea celulozei

Principiul metodei. Un mediu nutritiv selectiv pentru microorganismele celolitice (conținând drept sursă de carbon și energie celuloză = hârtie de filtru) se însămânțează cu diluții de sol. După incubare se urmărește atacul (degradarea) hârtiei de filtru. Pe baza acestui caracter și cu ajutorul tabelului statistic a lui Alexander se determină numărul cel mai probabil de microorganisme celolitice mezofile aerobe.

Materiale și medii nutritive

Probe de sol

Sticlă de ceas sterilă

Eprubete cu apă de robinet fiartă și răcită, sterilizate la 120°C, 30 de minute (9 ml/eprubetă)

Pipete gradate de 1 ml sterile

Benzi din hârtie de filtru calitativă având dimensiuni de 9/1 cm, sterile

Soluție de eritrozină fenicată (eritrozină 1 g și 5 g fenol în 100 ml apă distilată)

Cristal violet, soluție apoasă 0,1%

Mediu nutritiv, selectiv pentru microorganismele celolitice.

Tehnica de lucru

Se prepară un mediu nutritiv care are următoarea compoziție:

K_2HPO_4	1 g
$NaNO_3$	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,5 g
KCl	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,01 g
Apă distilată	1000 ml

pH mediului se stabilește la 7,5.

Mediul se repartizează în eprubete (9 ml/eprubetă). În fiecare eprubetă se introduce apoi o bandă de hârtie de filtru calitativă care are lungimea de 9 cm și lățimea de 1 cm. O porțiune din banda de hârtie trebuie să rămână la suprafața mediului. Eprubetele se închid cu dopuri de vată și apoi se autoclavează la 120°C, timp de 20 minute. Mediul se însămânțează cu diluții de sol. Acestea se prepară conform tehnicii descrise la pg. 69. Din fiecare diluție se însămânțează 5 eprubete cu mediu. Volumul inoculului este de 1ml. Vom avea și 5

eprubete neînsămânțate care vor constitui proba martor. Incubarea se face la 28°C timp de 4 săptămâni. Se examinează periodic apariția creșterii. Se notează caracteristicile creșterii, modul de colorare a hârtiei și regiunea benzii indicând dezintegrarea. După 4 săptămâni se fac observațiile finale. Se determină numărul eprubetelor, în cadrul fiecărui diluții, în care a avut loc creșterea. Se calculează apoi numărul cel mai probabil de microorganisme celololitice mezofile, aerobe/g sol, folosindu-se tabelul cu numerele cele mai probabile (Alexander, 1965).

Apoi se determină gradul de deteriorare al hârtiei. În acest scop se ia câte o eprubetă pozitivă de la fiecare diluție și se agită bine timp de 1 minut. Se repetă același lucru la o probă neînsămânțată. Se stabilește apoi comparativ cu martorul stadiul de deteriorare al hârtiei.

În continuare, din porțiunile deteriorate ale hârtiei se prepară frotiuri. Acestea se fixează la flacără și apoi se colorează cu eritrozină fenicată. Durata colorării este de 2-3 minute. Se spală și apoi se colorează 5-10 minute cu cristal violet soluție 0,1%. Frotiurile se examinează la microscop (obiectivul 90x). Se stabilește tipul de microorganisme și forma acestora.

16.2. Determinarea puterii amonificatoare a solului

Principiul metodei. La sol se adaugă compuși organici cu azot. Amoniacul degajat este absorbit de o soluție de acid sulfuric, având o concentrație cunoscută. Cantitatea de amoniac absorbit se determină prin titrarea soluției de acid sulfuric cu o soluție de NaOH.

Material necesar

- Borcane de ½ l
- Pahare Borrel
- Sol proaspăt
- Peptonă
- Uree
- H₂SO₄ 0,2 N
- NaOH 0,2 N
- Roșu de metil, soluție 0,2% în alcool 70%

Tehnica de lucru

Se lucrează cu 4 borcane de ½ litru. Borcanele pot fi închise ermetic. Se numerotează de la 1-4. În cele 4 borcane se adaugă sol, peptonă și uree conform tabelului 12.

Tabelul 12

Schema compostării

Nr. borcanului	Sol g	Peptonă g	Uree g	H ₂ SO ₄ 0,2 N ml
1.	-	-	-	20
2.	50	-	-	20
3.	50	0,5	-	20
4.	50	-	0,25	20

Substanțele se amestecă cu solul cu o spatulă sterilizată la flacăra și apoi răcită. Dacă solul este prea uscat, se poate umezi cu apă. În fiecare borcan se introduce un pahar Borrel conținând 20 ml acid sulfuric 0,2 N. Borcanele se închid ermetic și se pun la incubat la 30°C.

După 7 zile de incubare, cele 4 borcane se scot din termostat. Se scoate paharul Borrel din primul borcan și se adaugă apoi 5 picături de indicator (roșu de metil, soluție 0,2% în alcool etilic 70%). Conținutul paharului devine roșu datorită H₂SO₄ 0,2 N. Se titrează apoi conținutul paharului cu NaOH 0,2 N până la obținerea culorii galben-pai. Notăm numărul de ml de NaOH consumați. Se trece apoi la borcanele următoare și se procedează în mod identic, constatându-se că în aceste cazuri consumul de NaOH 0,2 N va fi mai mic, deoarece o parte din H₂SO₄ s-a neutralizat sub acțiunea NH₃ degajat.

Cantitatea de amoniac degajată se calculează după următoarea formulă:

$$P = (Q_1 - Q_n) \cdot f \cdot 3,406 \text{ mg NH}_3, \text{ în care}$$

Q_1 = Numărul de ml de NaOH 0,2 N, folosit la titrarea borcanului 1;

Q_n = Numărul de ml de NaOH 0,2 N, folosit la titrarea borcanelor 2,3 și 4;

f = factorul soluției de NaOH 0,2 N;

1 ml NaOH 0,2 N este echivalent cu 3,406 mg NH₃.

Rezultatele vor fi trecute în tabelul 13.

Tabelul 13

Cantitatea de NH_3 degajată în probele experimentate

Nr. borcanului	Varianta	Nr.ml NaOH 0,2 N folosiți la titrare	P (mg NH_3)
1	Fără sol		
2	Numai cu sol		
3	Cu sol + peptonă		
4	Cu sol + uree		

Cu cât cantitatea de NH_3 produsă este mai ridicată cu atât este mai pronunțată puterea amonificatoare a solului.

16.3. Determinarea puterii nitrificatoare a solului în mediu lichid

Principiul metodei. Mediile electiv pentru nitratbacterii și nitritbacterii se însămânțează cu diluții de sol. După incubare, mediile se analizează calitativ pentru nitriți și nitrați.

Material necesar

- Soluție salină Vinogradski
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- CaCO_3
- NaNO_2
- Eprubete
- Pipete gradate sterile
- Apă de robinet sterilă, repartizată în eprubete (9 ml/eprubetă) pentru prepararea diluțiilor de sol.
- Sticlă de ceas sterilă
- H_2SO_4 conc.
- Uree p.a. fin pulverizată
- Reactiv cu difenilamină. Acesta se prepară din 1 g difenilamină care se dizolvă în 100 ml acid sulfuric conc. După dizolvare soluția se toarnă peste 20 ml apă distilată.

Tehnica de lucru

Se prepară soluția salină Vinogradski care are următoarea compoziție: K_2HPO_4 5 g, MgSO_4 2,5 g, NaCl 2,5 g, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0,05 g, MnSO_4 0,05 g, apă distilată 1000 ml.

După dizolvarea ingredientelor, soluția se sterilizează la 120°C, timp de 30 minute, după care se poate păstra la rece timp îndelungat.

Se prepară apoi mediul pentru nitritbacterii care se compune din:

Soluție salină Vinogradski diluată 1:20	100 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,05 g
CaCO ₃	0,1 g

Mediul se repartizează în eprubete (2 ml/eprubetă) și se sterilizează la 110°C, timp de 20 minute.

Se trece apoi la prepararea mediului pentru nitratbacterii. Aceasta are următoarea compoziție:

Soluție salină Vinogradski diluată 1:20	100 ml
NaNO ₂	0,1 g
CaCO ₃	0,1 g

După dizolvarea ingredientelor, mediul se repartizează în eprubete (2 ml/eprubetă) și se sterilizează la 120°C, 20 de minute.

Mediile nutritive pentru nitritbacterii și cele pentru nitratbacterii se însămânțează cu diluții de sol (1 ml). Mediile însămânțate se pun la incubat, la 28°C, pentru 7-14 zile. După incubare se analizează calitativ nitriții și nitrații.

Analiza calitativă pentru nitritbacterii. În eprubetele cu mediul pentru nitritbacterii se cercetează prezența ionilor NO₂⁻. Nitritii se formează din amoniac sub acțiunea nitritbacteriilor. Nitriții formați pot fi oxidați mai departe până la nitrați sub acțiunea nitratbacteriilor. Atât nitriții cât și nitrații se pot pune în evidență cu reactivul pe bază de difenilamină. În fiecare eprubetă cu mediu însămânțat, precum și în eprubetele martor, se adaugă 1 ml acid sulfuric concentrat și 1 ml reactiv cu difenilamină. În prezența nitraților și nitriților se produce o colorație albastră. Intensitatea colorației se apreciază cu semnul +. Pentru controlul reactivului se adaugă într-o eprubetă 3 ml apă distilată + 1 ml acid sulfuric concentrat + 1 ml reactiv cu difenilamină. Nu trebuie să apară colorația albastră.

Analiza calitativă pentru nitratbacterii. Se cercetează prezența ionilor NO₃⁻ formați din nitriți, în eprubetele cu mediul pentru nitratbacterii. Pentru a elimina reacția dată de nitriții reziduali, neoxidați, se folosește ureea. Astfel în fiecare eprubetă se adaugă un vârf de spatulă de uree p.a. fin pulverizată. După agitare se adaugă 1 ml H₂SO₄ concentrat. Se agită și apoi se adaugă 1 ml reactiv de difenilamină. Apariția colorației albastre denotă prezența nitraților. Intensitatea colorației se notează prin semne +, aceasta fiind direct proporțională cu cantitatea nitraților.

16.4. Determinarea puterii denitrificatoare a solului în mediul lichid

Principiul metodei. Un mediu nutritiv conținând o substanță organică și un nitrat se însămânțează cu diluții de sol. În cursul incubării, nitrații sunt reduși sub acțiunea microorganismelor denitrificatoare până la N_2 . Ca produși intermediari se formează nitriți și amoniac. După incubare, se analizează calitativ nitrații, nitriții și amoniacul.

Material necesar

- Soluție salină Vinogradski
- KNO_3
- Glucoză
- $CaCO_3$
- Apă de robinet sterilă pentru diluții de sol
- Uree p.a. fin pulverizată
- Reactiv cu difenilamină
- Acid sulfuric conc.
- Reactiv Griess I
- Azotat mercurios [$Hg_2(NO_3)_2$] soluție saturată
- NaOH soluție 8-10%
- Pipete gradate sterile
- Sticlă de ceas sterilă
- Sol proaspăt

Tehnica de lucru

Se prepară un mediu nutritiv care are următoarea compoziție:

Soluție salină Vinogradski diluată 1:20 100 ml

KNO_3 0,2 g

Glucoză 1 g

$CaCO_3$ 0,5 g

După dizolvarea substanțelor, mediul se repartizează în eprubete (2 ml/eprubetă). Se sterilizează la $110^{\circ}C$, 20 de minute. Apoi se însămânțează cu diluții de sol. Incubarea durează 7-14 zile, la $28^{\circ}C$.

Analiza calitativă pentru denitrificare. Aceasta cuprinde analiza nitraților reziduali, care nu au fost reduși, analiza nitriților și a amoniacului, care au apărut ca produși intermediari ai denitrificării. În acest scop, conținutul fiecărei eprubete se repartizează în mod egal în 3 tuburi de hemoliză.

Analiza nitraților reziduali. În primul tub se adaugă o cantitate mică de uree pentru a elimina reacția dată de nitriții formați în urma acțiunii microorganismelor denitrificatoare, apoi se pipetează 0,3 ml

acid sulfuric concentrat și 0,3 ml reactiv cu difenilamină. În prezența nitratilor apare o colorație albastră.

Analiza nitriților. În al doilea tub se adaugă 0,3 ml reactiv Griess I și 0,3 ml Griess II. În prezența nitriților apare o colorație roșie.

Analiza amoniacului. Se cercetează în al 3-lea tub cu ajutorul azotatului mercurilor. În acest scop, în tub se adaugă 2 ml NaOH 8-10%. Apoi pe o bucată de hârtie de filtru calitativă se pune o picătură dintr-o soluție saturată de azotat mercurilor. Cu această hârtie se acoperă gura tubului analizat. Se încălzește tubul la flacără. În prezența NH_3 , pe hârtia de filtru apare un precipitat negru.

16.5. Fixarea biologică a azotului molecular

Principiul metodei. Un mediu nutritiv lichid, lipsit de azot legat, având pH 5 și un mediu nutritiv similar, având pH 7,5 se însămânțează cu *Azotobacter chroococcum* sau cu *Beijerinckia indica*. După incubare se determină cantitatea azotului fixat prin metoda Kjeldahl.

Materiale și medii de cultură

- Culturi pure de *Azotobacter chroococcum* și *Beijerinckia indica*
- Cutii Petri sterile
- Pipete gradate sterile de 1 ml
- Soluție sterilă de molibdat de Na ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), conținând 50 μg Mo per ml (12,6 mg de molibdat de sodiu se dizolvă în 100 ml apă distilată și se autoclavează la 120°C , 20 minute).
- Aparatul necesar pentru metoda Kjeldahl
- Reactivii necesari pentru metoda Kjeldahl:
- K_2SO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, seleniu, H_2SO_4 concentrat, acid boric 2%, indicator (0,25 g albastru de metilen + 0,38 g roșu de metil în 300 ml etanol), NaOH 40%, HCl soluție 0,1 N.
- Zn pulverizat
- Mediu nutritiv lichid, lipsit de azot legat, pH 5
- Mediu nutritiv lichid, lipsit de azot legat, pH 7,5

Tehnica de lucru

Se prepară mediul nutritiv lichid, lipsit de azot legat, pH 5, care se compune din:

Glucoză	20 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,1 g

Apă distilată

1000 ml

Se distribuie câte 50 ml în flacoane Erlenmeyer de 500 ml. Se închid cu dopuri de vată și se autoclavează la 110°C , 30 de minute. Glucoza se omite din flaconul care va constitui proba martor (neinoculată).

Se prepară apoi mediul nutritiv lichid, lipsit de azot legat, pH 7,5 care se compune din:

Glucoză

20 g

K_2HPO_4

1 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,5 g

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,1 g

CaCO_3

2 g

Apă distilată

1000 ml

Se ajustează pH la 7,5

Se repartizează câte 50 ml în flacoane Erlenmeyer de 500 ml. Se autoclavează la 110°C , 30 minute. Din proba martor se elimină și în acest caz glucoza.

Se inoculează apoi mediile cu *Azotobacter chroococcum* și *Beijerinckia indica*, existând pentru fiecare specie în parte următoarele variante:

I. Mediu lichid, pH 5 - neinoculat

II. Mediu lichid, pH 5 - inoculat cu 1 ml de cultură bacteriană

III. Mediu lichid, pH 5 - inoculat cu 1 ml cultură bacteriană +

1 ml soluție de molibdat de sodiu

IV. Mediu lichid, pH 7,5 - neinoculat

V. Mediu lichid, pH 7,5 - inoculat cu 1 ml cultură bacteriană

VI. Mediu lichid, pH 7,5 - inoculat cu 1 ml cultură bacteriană +

1 ml soluție de molibdat de sodiu

Incubarea durează 14 zile, la 28°C . După incubare se transferă conținutul fiecărui flacon într-un balon Kjeldahl de 800 ml. Se trece la determinarea azotului total conform metodei Kjeldahl. Se adaugă 10 g K_2SO_4 , 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g seleniu și 40 ml H_2SO_4 concentrat. Se pun și câteva perle de sticlă în balon și apoi acesta se pune pentru mineralizare. Se încălzește cu grijă. Probele bogate în zaharuri se vor carboniza și vor spumega, de aceea necesită o observație atentă. Când pericolul producerii spumei a trecut, se mărește temperatura și se aduce amestecul la fierbere. Se continuă încălzirea până se obține o soluție clară gălbui verzuie (aproximativ după 2 ore) și încă cel puțin 15 minute după aceea. Când mineralizarea este completă, se lasă balonul să

se răcească. În acest interval într-un alt flacon Erlenmeyer se adaugă 40 ml soluție de acid boric 2% și 6 picături de indicator.

La proba mineralizată și răcită se adaugă 200 ml apă distilată. Dacă începe să fiarbă la adăugarea apei se lasă să se mai răcească în continuare. Apoi cu precauție se adaugă 140 ml NaOH 40%. Încet hidroxidul fuge jos sub gâtul balonului și se stratifică la bază. Flaconul nu se agită. Se adaugă perle de sticlă suplimentare și granule de Zn pulverizat pentru a reduce umflarea. Se învârtă flaconul la început ușor și apoi se amestecă bine conținutul. Se trece la distilare în aparatul Parnas-Wagner. Se distilă 200 de ml în acid boric. Se titrează apoi conținutul flaconului cu HCl 0,1 N. Culoarea indicatorului se schimbă repede în gri la punctul final. Aceasta este purpurie în condiții de aciditate și verde în condiții alcaline. Pe baza numărului de ml de HCl necesari pentru titrare se calculează conținutul în azot al probei.

Izolarea bacteriilor fixatoare de azot, aerobe, nesimbiotice din sol. Mediul nutritiv lichid, lipsit de azot legat, pH 5 și cel cu pH 7,5 se solidifică prin adăugare de agar-agar în proporție de 2%. Se toarnă în cutii Petri sterile. După ce s-a solidificat, se împrăștie pe suprafața lui 0,5 g sol proaspăt fin mărunțit sau se însămânțează cu grăuncioare de sol. Se lasă apoi cutiile nemișcate și după 30 minute de așteptare se pun la incubat cu capacul în jos, la 28°C, pentru 14 zile.

Periodic se fac observații și se notează dezvoltarea bacteriilor. Se urmăresc în special coloniile mucoide care pot fi incolore, brun deschis - sau brun-închise. Se prepară frotiuri și se examinează la microscop celulele din aceste tipuri de colonii. Se compară cu cele din culturile pure de *Azotobacter chroococcum* și *Beijerinckia indica*.

Pentru izolarea lor în culturi pure se suspendă materialul dintr-o colonie mucoidă într-un volum mic de apă de robinet sterilă și se însămânțează în striuri în cutii Petri cu mediu solid lipsit de azot legat. Se incubează 7 zile la 28°C. De aici se selectează coloniile caracteristice care apar omogene și se fac însămânțări pe același tip de mediu, în eprubete. Se pun la incubat pentru 7 zile la 28°C. Se notează caracteristicile coloniilor; culoarea, abundența, consistența etc. Se examinează la microscop și se notează dimensiunile, forma, existența granulelor sau a altor incluzii celulare, precum și mobilitatea.

Pentru a dovedi fără echivoc că microorganismele izolate din sol sunt capabile de fixarea azotului molecular, se incubează fiecare pe mediul lichid, lipsit de azot legat. După o incubare de 14 zile la 28°C, se transferă materialul într-un balon Kjeldahl, se mineralizează și se distilă pentru a determina cantitatea în mg a azotului fixat.

16.6. Oxidarea sulfului în sol

Principiul. Probe de sol se tratează cu sulf elementar sau cu sulf elementar + glucoză. Drept martor servește o probă de sol netratată. Probele de sol se pun la incubat. În cursul incubării sulful este oxidat la sulfați sub acțiunea microorganismelor sulfoficatoare. După incubare, se determină cantitatea sulfatilor, sub formă de BaSO_4

Material necesar

- Probe de sol, a căror umiditate și capacitate de reținere a apei se cunoaște, trecute prin site cu ochiuri de 2 mm
- Sulf elementar
- Glucoză
- Soluție de acetat de amoniu (39 g acetat de amoniu se dizolvă în 1000 ml acid acetic 0,25 N)
- Cărbune activ
- Soluție mămă de sulfat de magneziu ($0,3852 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se dizolvă în 1000 ml apă distilată, fiartă și răcită, ceea ce reprezintă $500 \mu\text{g SO}_4 - \text{S}/10 \text{ ml}$)
- Soluție de gumă arabică 0,5%
- BaCl_2
- Fotocolorimetru

Tehnica de lucru

Se cântăresc în baloane de 250 ml cantități de sol echivalente cu 100 g sol absolut uscat. Primul balon reprezintă proba martor. În balonul al 2-lea se adaugă 0,5 g sulf elementar, iar în balonul al 3-lea 0,5 g sulf elementar + 0,5 g glucoză. Substanțele adăugate se amestecă uniform cu solul cu ajutorul unei spatule. Amestecurilor li se adaugă apă distilată în proporție de 60% din capacitatea pentru apă a solurilor. Baloanele se închid cu dopuri de vată și se pun la incubat, la 28°C , pentru 14 zile.

După incubare se trece la determinarea turbidimetrică a sulfatilor din cele 3 probe de sol. În acest scop se cântăresc din fiecare sol câte 10 g, pe câte o sticlă de ceas și se introduc în câte un balon de 50 ml, în care se adaugă apoi 25 ml soluție de acetat de amoniu pentru extragerea sulfatilor. Amestecul se agită bine timp de 30 minute. Apoi se adaugă 0,2 g cărbune activ, după care se agită

din nou timp de 3 minute. Se filtrează prin hârtie de filtru într-un balon uscat. Din filtrat se iau 10 ml și se pun în eprubete.

Cantitatea sulfatilor din filtrate se determină cu ajutorul unei curbe etalon. Pentru obținerea acestei curbe din soluția etalon mămă se prepară 5 soluții etalon având concentrații descrescânde de MgSO_4 : 500, 250, 125, 62,5 și 31,25 $\mu\text{g S-SO}_4/10\text{ ml}$, precum și 0 $\mu\text{g S-SO}_4/10\text{ ml}$ (10 ml apă distilată).

În continuare în eprubetele cu filtrat, precum și în cele cu soluții etalon se adaugă câte 1 ml de gumă arabică. Se agită și apoi se introduc în fiecare eprubetă câte 0,5 g cristale de BaCl_2 . Eprubetele se agită până la dizolvarea BaCl_2 . Când BaCl_2 reacționează cu sulfatii se formează BaSO_4 . Se trece la fotocolorimetare, folosind filtrul albastru (440 nm) al FEK-M. Stabilind extincțiile pentru probele etalon se construiește curba etalon. De pe curbă, pe baza extincțiilor de la probele experimentale se citește cantitatea $\text{SO}_4\text{-S}$ în μg . Se calculează apoi cantitatea sulfatilor în 100 g sol absolut uscat, precum și procentul de oxidare. Datele obținute se trec în tabelul 14.

Tabelul 14

Rezultatele obținute privind oxidarea sulfului în sol

Numărul balonului	Varianta	$\text{SO}_4\text{-S}/100\text{ g sol}$ absolut uscat (g)	Oxidarea S la $\text{SO}_4\text{-S}$ %
1	Martor		
2	Numai cu sulf		
3	Cu sulf + glucoză		

16.7. Determinarea potasiului asimilabil din sol cu ajutorul lui *Aspergillus niger*

Principiul metodei. La un mediu nutritiv lipsit de K se adaugă o oarecare cantitate din solul al cărui conținut în K asimilabil vrem să-l determinăm. Mediul se însămânțează cu spori de *Aspergillus niger* și se pune la incubat. După incubare, se află greutatea miceliului care este proporțională cu cantitatea K asimilabil din sol. Cantitatea K se citește de pe o curbă etalon care se obține prin cultivarea lui *A. niger* pe mediu conținând cantități cunoscute de K_2SO_4 .

Material necesar

- Mediul Mehlich
- Pahare Borrel

- K_2SO_4 p.a.
- Suspensie de spori de *Aspergillus niger*
- Pipete gradate sterile
- Creuzete de porțelan

Tehnica de lucru

La început se prepară mediul Mehlich care are următoarea compoziție:

Zaharoză	100 g
Acid citric	10 g
Peptonă	1 g
$(NH_4)_2SO_4$	6 g
$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	0,720 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,215 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0059 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0044 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005 g
Apă distilată	1000 ml

Mediul se sterilizează la $115^\circ C$ timp de 10 minute, după care se repartizează în pahare Borrel, câte 30 ml în fiecare. Se va lucra cu un număr diferit de variante în funcție de probele de sol ce urmează a fi analizate. Pentru construirea curbei etalon sunt necesare 5 variante care se prepară după cum urmează:

Varianta I:

- 4 pahare Borrel cu câte 30 ml mediu nutritiv fiecare +
- 1 ml soluție de K_2SO_4 1,5% (echivalent cu 6,730 mg K);

Varianta II.

- 4 pahare Borrel cu câte 30 ml mediu nutritiv +
- 1 ml soluție de K_2SO_4 1% (echivalent cu 4,408 mg K);

Varianta III.

- 4 pahare Borrel cu câte 30 ml mediu nutritiv +
- 1 ml soluție K_2SO_4 0,75% (echivalent cu 3,365 mg K);

Varianta IV.

- 4 pahare Borrel cu câte 30 ml mediu nutritiv +
- 1 ml soluție de K_2SO_4 0,5% (echivalent cu 2,204 mg K);

Varianta V.

- 4 pahare Borrel cu câte 30 ml mediu nutritiv +
- 1 ml soluție de K_2SO_4 0,3% (echivalent cu 1,346 mg K);

La variantele experimentale compoziția va fi următoarea:

4 pahare Borrel cu câte 30 ml mediu nutritiv +

1 ml apă distilată +

2,5 g sol uscat pulverizat.

Mediul din fiecare pahar se amestecă cu soluția de K_2SO_4 , respectiv cu solul. Urmează însămânțarea mediului cu *A.niger*. În acest scop se folosește o suspensie de spori de *A.niger* cultivat pe mediul cu malț gelozat (malț 25 g, agar-agar 20 g, apă distilată 1000 ml) în apă de robinet sterilă. Suspensia trebuie să fie destul de densă (culoare gri închisă). Volumul inoculului este de 0,5 ml pentru fiecare pahar. După însămânțare, paharele se închid cu câte o placă de sticlă, punând un strat de vată între partea inferioară a plăcii și marginea paharului. Paharele se pun apoi la incubat la 30°C timp de 7 zile. După 7 zile se recoltează miceliile cu ajutorul unei pensete. Se spală ușor cu apă distilată pentru a îndepărta sărurile. Miceliile de la fiecare variantă se introduc într-un creuzet de porțelan, etichetat și cântărit în prealabil. Creuzetele de la toate variantele se pun apoi la etuvă, la început la 70-90°C pentru 12-14 ore, apoi la 105°C pentru 2 ore. În continuare creuzetele se cântăresc din nou. Cunoscând astfel greutatea fiecărui creuzet cu și fără micelii se poate calcula greutatea miceliilor la fiecare variantă în parte. datele obținute vor fi trecute în tabelul 15.

Tabelul 15

Greutatea miceliilor la variantele experimentale

Varianta	Greutatea creuzetului		Greutatea miceliului
	Fără micelii	Cu micelii	
I			
II			
III			
IV			
V			
VI			

Greutatea miceliilor de la variantele I-V se reprezintă grafic în funcție de cantitatea K (fig.29).

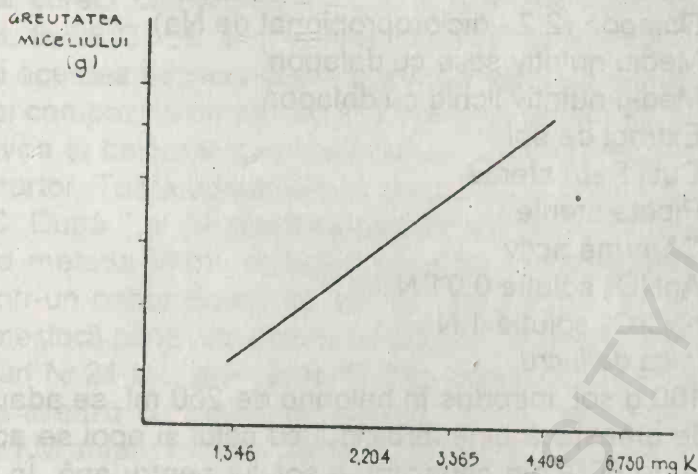


Fig. 29. Curba etalon pentru determinarea K asimilabil din sol

Pe baza greutății miceliului de la variantele experimentale se citește de pe curbă conținutul în K al probei de sol. Se calculează apoi cantitatea K la 100 g sol. Pentru interpretarea datelor obținute, referitoare la deficiența solului în K, ne vom folosi de datele din tabelul 16.

Tabelul 16

Relația dintre greutatea miceliului și deficiența solului în K asimilabil

Greutatea a 4 miceli la variantea înșământată cu sol	Nivelul deficienței solului în K asimilabil
Mai mică de 1,40 g	Solul este foarte deficitar în K
Între 1,40 - 2,0 g	Solul este moderat deficitar în K
Mai mare de 2,0 g	Solul nu este deficitar în K

16.8. Transformarea microbiană a pesticidelor

Principiul metodei. Se compostează solul cu ierbicidul luat în studiu (dalapon). Din amestecul compostat se prepară diluții, care vor servi la înșămânțarea mediului nutritiv solid ce conține și dalapon. Din coloniile apărute se vor inocula medii nutritive lichide. În final se determină cantitatea ierbicidului descompus pe baza formării clorului (Cl^-) eliberat sub formă ionică.

Materiale și medii nutritive

- Probe de sol
- Dalapon (2,2 - dicloropropionat de Na)
- Mediu nutritiv solid cu dalapon
- Mediu nutritiv lichid cu dalapon
- Extract de sol
- Cutii Petri sterile
- Pipete sterile
- Cărbune activ
- AgNO_3 soluție 0,01 N
- K_2CrO_4 soluție 1 N

Tehnica de lucru

La 100 g sol, introdus în baloane de 250 ml, se adaugă 50 mg dalapon. Se amestecă bine ierbicidul cu solul și apoi se adaugă apă în proporție de 60% din capacitatea solului pentru apă. În paralel se pregătește în mod identic și o probă de sol netratat cu ierbicid. Baloanele se închid cu dopuri de vată și se cântărește apoi fiecare balon în parte. În continuare, baloanele se pun la incubat, la 28°C pentru 4-6 săptămâni. În acest interval se menține umiditatea optimă. În acest scop se cântăresc periodic baloanele și se completează apa pierdută până se ajunge la greutatea inițială.

După terminarea compostării, se prepară un mediu nutritiv solid cu dalapon. Acesta conține următoarele ingrediente:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Extract de sol	500 ml
Agar-agar	20 g
Apă distilată	500 ml
pH 7,5	

Mediul se repartizează câte 100 ml în baloane și se sterilizează prin autoclavare (110°C , 30 minute). După răcire la 60°C se adaugă în fiecare balon 3 ml de dalapon soluție 1% (aceasta s-a sterilizat fie prin tindalizare, la 70°C , fie prin filtrare) și 0,2 g CaCO_3 (autoclavat separat, la 120°C 30 minute și apoi uscat în etuvă la 105°C).

Din solul compostat cu dalapon se prepară diluțiile: 1/10; 1/100 și 1/1000.

Din fiecare diluție apoi se însămânțează câte două cutii Petri care conțin mediul solid descris mai sus. Volumul inoculului este de 1

ml. Mediul se omogenizează bine în cutia Petri pentru a se dispersa cât mai corect carbonatul de Ca. Cutiile astfel inoculate se pun la incubat, la 28°C. Se aleg celule din coloniile înconjurate de o zonă clară și acestea se inoculează în mediul lichid cu dalapon (mediul are aceeași compoziție cu cel descris mai sus, dar nu conține agar-agar). Vom avea și baloane cu mediu lichid neînsămânțate, care vor servi ca și martor. Toate baloanele cu mediu lichid se pun apoi la incubat, la 28°C. După 7 și 14 zile de incubare se aplică testul pentru clorură folosind metoda Mohr. În acest scop se transferă 20 ml din mediul lichid într-un pahar Borrel de 100 ml. Se adaugă 0,2 g cărbune activ și se amestecă până la decolorarea soluției. Se filtrează prin hârtie de filtru Whatman Nr.24 sau prin hârtie de filtru calitativă. Din filtrat se iau 15 ml care se titrează cu soluția de AgNO_3 0,01 N, utilizând 2-3 picături de K_2CrO_4 1 M drept indicator. Se titrează până la culoarea roșie brunie care rămâne neschimbată și după 20 secunde de agitare. Pe baza datelor obținute se calculează mg de clorură la 100 ml mediu și procentul de Cl eliberat din dalapon sub acțiunea microorganismelor.

16.9. Determinarea activității biologice globale a solului pe baza CO_2 produs

(Determinarea respirației solului)

Principiul metodei. În solul din care au fost îndepărtate plantele superioare, producerea CO_2 se datorește activității vitale a microorganismelor. Adăugarea substanțelor organice stimulează dezvoltarea microorganismelor și, astfel, devine mai intensă producerea de CO_2 . CO_2 format este absorbit de o soluție de NaOH de concentrație cunoscută. Cantitatea CO_2 absorbit se determină prin titrarea soluției de NaOH cu o soluție de HCl.

Material necesar

- Borcane de $\frac{1}{2}$ l
- Pahare Borrel
- Sol proaspăt
- Glucoză
- Celuloză pulvis
- Paie pulverizate
- NaOH 0,2 N
- HCl 0,1 N
- BaCl_2 , soluție 20%
- Timolftaleină, soluție alcoolică 1%

Tehnica de lucru

Se folosesc 5 borcane de $\frac{1}{2}$ l, care se pot închide ermetic. Se numerotează de la 1-5. În borcanele 2, 3, 4 și 5 se introduc câte 50 g sol proaspăt, după care se mai adaugă glucoză, celuloză pulvis și paie pulverizate conform tabelului 17.

Tabelul 17

Schema experienței pentru determinarea respirației solului

Numărul borcanului	Sol g	Glucoză g	Celuloză g	Paie g	NaOH 0,2 N ml
1	-	-	-	-	50
2	50	-	-	-	50
3	50	0,1	-	-	50
4	50	-	1	-	50
5	50	-	-	1	50

Substanțele se amestecă cu solul, folosind o spatulă sterilizată prin flambare și apoi răcită. Dacă solul este uscat se mai adaugă și apă distilată (circa 25%). Apoi în fiecare borcan se introduce un pahar Borrel conținând 50 ml NaOH 0,2 N. Borcanele se închid ermetic și se pun la incubat la temperatura camerei sau la 30°C. După 7 zile de incubare conținutul paharelor Borrel se titrează cu HCl 0,1 N. În prealabil în fiecare pahar se introduc 5 ml soluție de BaCl₂ 20% și 5 picături de timolftaleină 1%. Conținutul paharului devine albastru, ceea ce înseamnă că NaOH 0,2 N nu a fost în întregime neutralizat de către CO₂. Dacă lichidul nu devine albastru, aceasta denotă că borcanul nu a fost închis ermetic și s-a fixat CO₂ din aer ori s-au produs cantități de CO₂ foarte mari, peste capacitatea soluției de NaOH folosite de a fixa CO₂. După adăugarea timolftaleinei (care servește ca indicator), lichidul din pahar se titrează cu HCl 0,1 N până la dispariția colorației albastre (lichidul devine alb).

Cei 50 ml NaOH 0,2 N necesită teoretic 100 ml HCl 0,1 N. Însă, consumul de HCl 0,1 N va fi mai mic, deoarece NaOH a fixat CO₂ din aerul din borcan. Se notează numărul de ml de HCl 0,1 N folosiți.

Rezultatele se calculează pe baza cifrelor obținute la titrarea cu HCl 0,1 N. Dacă Q₁ reprezintă numărul de ml de HCl 0,1 N folosiți pentru titrarea NaOH 0,2 N din paharul de la borcanul fără sol și Q_n - numărul de ml de HCl 0,1 N folosiți pentru titrarea NaOH 0,2 N din paharele de la borcanele cu sol, atunci producerea de CO₂ (P) se poate calcula cu ajutorul formulei:

$$P = (Q_1 - Q_n) \cdot f \cdot 2,2 \text{ mg CO}_2$$

f = factorul soluției de HCl 0,1 N;

2,2 = 1 ml de HCl 0,1 N este echivalent cu 2,2 mg CO₂.

Rezultatele obținute vor fi trecute în tabelul 18.

Tabelul 18

Cantitatea de CO₂ degajată în probele de sol analizate

Nr. borcan	Varianta	HCl 0,1 N folosit pentru titrarea soluției de NaOH	P mg CO ₂
1	Fără sol		
2	Numai cu sol		
3	Cu sol + glucoză		
4	Cu sol + celuloză		
5	Cu sol + paie		

16.10 Evidențierea bacteriilor din nodozitățile radiculare ale plantelor leguminoase

Principiul metodei. Bacteriile din genurile *Rhizobium* și *Bradyrhizobium*, bastonașe aerobe, Gram-negative, invadează rădăcinile plantelor leguminoase și induc formarea nodozităților. Plantele leguminoase care sunt efectiv nodulate fixează în mod apreciabil N₂. Asociația rizobiilor cu plantele leguminoase este cu adevărat simbiotică. Locul simbiozei este nodozitatea de pe rădăcină, mai precis membranele care înconjoară celulele bacteroidale (= bacterozii) de *Rhizobium* și *Bradyrhizobium* unde are loc reacția primară de fixare a azotului. Complexul *Rhizobium* - plantă leguminoasă este de mare semnificație pentru îmbogățirea solului în azot legat.

Materiale și medii de cultură

- Rădăcini cu nodozități de la plante leguminoase
- Seminte de lucernă (*Medicago sativa*)
- Mediu nutritiv cu manitol-extract de drojdii și roșu de Congo.

Acesta are următoarea compoziție:

Manitol	10 g
Extract de drojdii	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCO ₃	3 g
Roșu de Congo, soluție apoasă 1%	2,5 ml
Agar-agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

- Soluție Bryan sterilă, fără azot adăugat. Aceasta se compune din:

KCl	10 g
CaSO ₄ •2H ₂ O	2,5 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	2,5 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,5 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃ •6H ₂ O	2,5 g

Se amestecă toate sărurile într-un mojar. Se majorează până se obține o pudră fină. Apoi, 1,5 g mixtură de săruri se adaugă la 1000 ml apă distilată. Se autoclavează la 120°C, timp de 30 minute și se folosește ca soluție nutritivă.

- Soluție Bryan sterilă, cu azot adăugat. Se prepară ca și soluția Bryan, dar în loc de CaSO₄•2H₂O se adaugă Ca(NO₃)₂

- Alcool etilic 95%

- HgCl₂, soluție 0,1%

- Apă de robinet sterilă

- Cutii Petri sterile

- Soluție de albastru de metilen Löffler (0,3 g albastru de metilen se dizolvă în 30 ml alcool etilic 95% și apoi se adaugă 70 ml de KOH 0,01%)

- Eritrozină fenicată (carbol eritrozină). Se compune din două soluții: soluția A - eritrozină 5% în alcool etilic 70%; soluția B - eritrozină 1% în fenol 5%. Se colorează cu soluția A 10 minute, după care se spală și se colorează cu soluția B încă 10 minute.

- Nisip grosier, spălat.

Tehnica de lucru

Se studiază 3 probleme.

a) Examinarea bacteriilor din nodozitățile radiculare

Se lucrează cu nodozități radiculare de la plante leguminoase proaspete. Suprafața nodozităților se sterilizează cu HgCl₂ soluție 0,1%. În acest scop, se introduc nodozitățile radiculare într-un cristalizor cu soluție de sublimat și se țin două minute. Apoi se spală bine cu apă de robinet sterilă. În continuare, o nodozitate se suspendă în câteva picături de apă de robinet sterilă (3-5 picături). Se zdrobește nodozitatea cu o pensetă sterilă și se amestecă bine cu apa. Apoi se transferă o picătură pe o lamelă curată și se execută un preparat în picătură suspendată. Din același amestec se mai efectuează două preparate (frotiuri). Se usucă, se fixează cu alcool etilic 90%, timp de 10 minute. Un frotiu se colorează cu albastru de metilen Löffler, timp de 3 minute, iar celălalt cu eritrozină fenicată. Se spală, se

usucă și se examinează la microscop. Se notează forma, dimensiunile și caracteristicile de colorare ale bacteriilor din nodozități.

b) Izolarea rizobiilor din nodozități

Se spală rădăcinile cu nodozități de pământ și cu grijă se taie o nodozitate de pe rădăcină, lăsând și o mică porțiune a rădăcinii atașate. Îndepărtăm la un curent de apă orice particulă de sol de pe nodozitate. Se pune nodozitatea într-o cutie Petri cu soluție de HgCl_2 și se ține în stare imersată timp de 5 minute. Se utilizează apoi o pensetă sterilă pentru a transfera nodozitatea într-o altă cutie Petri ce conține apă de robinet sterilă. Apoi se iau 6 cutii Petri sterile notate de la 1-6. Se introduce în fiecare 1 ml apă de robinet sterilă. Se scoate nodozitatea din apa de robinet sterilă și se introduce în cutia Petri nr.1. Aici se zdrobește cu ajutorul unei pensete sterile. Se amestecă bine țesutul nodular cu apa. Se transferă apoi două încărcături de ansă (câte o picătură de lichid în ochiul ansei) în cutia Petri nr.2 și se clătește ansa în apa de robinet sterilă. Se omogenizează bine suspensia. Se repetă apoi această operație și la cutiile Petri 3, 4, 5 și 6. În cele 6 cutii Petri se toarnă apoi mediul nutritiv cu manitol-extract de drojdii - roșu de Congo-agar, lichefiat și răcit la $45-48^\circ\text{C}$. Se omogenizează bine mediul cu suspensia bacteriană. După solidificarea mediului, cutiile Petri se pun la incubat, la 28°C pentru 7 zile. După incubare, se examinează coloniile apărute. Se efectuează preparate microscopice între lamă și lamelă, precum și frotiuri colorate. Colorarea se face cu albastru de metilen Löffler și cu eritrozină fenicată. În urma examinării la microscop se compară celulele obținute pe mediul nutritiv cu cele evidențiate din nodozități.

c) Nodularea (formarea de nodozități) la lucernă

Se utilizează 8 tuburi de sticlă de dimensiunile 250/25mm. În fiecare tub se adaugă 50 g nisip de cuarț spălat. În primele 4 tuburi se adaugă câte 10 ml soluție Bryan sterilă, fără azot adăugat, iar în ultimele 4 tuburi câte 10 ml soluție Bryan sterilă cu azot adăugat. Se amestecă bine nisipul cu soluția Bryan. Tuburile se închid cu dopuri de vată și se autoclavează la 120°C , 30 minute.

În continuare, se distruge microflora de pe suprafața semințelor de lucernă în felul următor: se pun semințele în cutii Petri sterile și se acoperă cu alcool etilic 95%, lăsând să stea 5 minute, apoi se îndepărtează alcoolul și se adaugă soluție de HgCl_2 și se ține 5 minute; în final se spală de 6 ori cu apă de robinet sterilă.

Cu ajutorul unei pensete sterile se transferă câte 2-4 semințe cu suprafața sterilizată în tuburile 1,2 și respectiv 5,6. Se inoculează

semințele cu suprafața sterilizată rămase cu o suspensie densă de *Rhizobium meliloti*. Suspensia bacteriană se toarnă direct peste semințe și se omogenizează bine. Apoi, cu ajutorul unei pensete sterile se introduc câte 2-4 semințe din acest amestec în tuburile 3,4 și respectiv 7,8.

Tuburile astfel pregătite se mențin la lumină, dacă este posibil în casa de vegetație, adăugându-se apă distilată sterilă sau soluție Bryan sterilă pentru a menține o umiditate corespunzătoare a nisipului. Se notează viteza de creștere a plantelor în toate tuburile, urmărindu-se diferențele dintre plantele crescute din semințe neinoculate și cele crescute din semințe inoculate, fără sau cu adaos de azot. După câteva săptămâni (5-10) se spală nisipul de pe rădăcini. Se observă gradul de nodulare și tipul de nodozități, precum și vigoarea, dimensiunile și culoarea plantelor. Se fac și determinări de substanță uscată. Conținutul nodozităților se examinează la microscop și se compară imaginea obținută cu observațiile efectuate la nodozitățile existente la plantele crescute în condiții de câmp.

16.11. Evidențierea efectului de rizosferă

Principiul metodei. Rizosfera desemnează zona de sol din jurul rădăcinilor. În această zonă se găsește un număr mai mare de microorganisme, acestea fiind cu mult mai numeroase decât în restul solului. Bacteriile sunt afectate mai mult decât alte grupe de microorganisme. Există efecte de rizosferă calitative și cantitative produse la diferite plante și chiar la aceeași plantă în diferite perioade de vegetație. Localizarea microorganismelor în rizosferă se datorește în primul rând exudației substanțelor organice de către rădăcinile plantelor, dar rădăcinile pot, de asemenea, modifica compoziția rizosferei, concentrația nutrienților minerali și conținutul în umiditatea solului înconjurător. Desigur, activitatea microbiană vastă în zona rădăcinii influențează planta. Unii produși microbieni stimulează, iar alții inhibă creșterea plantei, populația rizosferică putând afecta respirația rădăcinii și absorbția ionilor.

Materiale și medii de cultură

- Probe de sol: rădăcini cu sol rizosferic atașat; sol din același teren (câmp) dar fără rădăcini, colectat de la suprafață și sol din același teren colectat de la adâncimea de circa 35 cm.

- Extract de sol agarizat, compus din:

- | | |
|----------------------|-----|
| - Peptonă | 1 g |
| - Extrăct de drojdii | 1 g |

- K_2HPO_4	0,4 g
- $(NH_4)_2HPO_4$	0,5 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
- $FeCl_2$	0,01 g
- $CaCl_2$	0,1 g
- Extract de sol	250 ml
- Agar-agar	15 g
- Apă de robinet	750 ml
pH 7,4	

Se fierbe 30 minute și apoi se filtrează. Se sterilizează final prin autoclavare la $112^{\circ}C$, 20 minute.

- Baloane cu 9 și 99 ml apă de robinet sterilă

- Baloane conținând 95 ml apă de robinet sterilă și perle de sticlă sterilizate

- Pipete gradate de 1 ml sterile

- Cutii Petri sterile

Tehnica de lucru

Rădăcinile plantei sunt scuturate cu grijă pentru a îndepărta particulele de sol slab aderente. O cantitate din rădăcinile cu sol rizosferic atașat se introduce într-un balon ce conține 95 ml apă de robinet sterilă și o cantitate mică de perle de sticlă. Amestecul se agită puternic timp de 15 minute. Din suspensia obținută se prepară apoi diluții de 10^{-6} și 10^{-7} utilizând pentru diluare apă de robinet sterilă. Din solul nerizosferic se prepară diluții de 10^{-5} și 10^{-6} , iar din solul de la adâncimea de 35 cm se prepară diluții de 10^{-4} și 10^{-5} . Din fiecare diluție se inoculează 5 cutii Petri. Volumul inoculului este de 1 ml. Apoi în cutiile Petri inoculate se toarnă mediul cu extract de sol agarizat, lichefiat și răcit la $45-48^{\circ}C$. După solidificarea mediului, cutiile Petri se pun la incubat la $28^{\circ}C$ timp de 7 zile. După incubare, se determină numărul de colonii, stabilind apoi numărul de bacterii per g sol rizosferic, respectiv per g sol nerizosferic.

În continuare, pentru a stabili dacă există diferențe semnificative între solul rizosferic și cel nerizosferic, în ceea ce privește tipul morfologic este necesar să caracterizăm formele care predomină. Din cutiile Petri mai reprezentative, de la fiecare sol, se aleg 100 de colonii din care se izolează bacteriile în culturi pure pe extractul de sol agarizat. Pentru a grupa bacteriile din punct de vedere morfologic, se efectuează din fiecare cultură frotiuri care se colorează după metoda Gram. Pe baza examenului microscopic se clasifică (se încadrează) în următoarele categorii stabilite de Taylor și Lochhead în anul 1938:

- Grupul I: bastonașe scurte, Gram-pozitive
- Grupul II: bastonașe scurte, Gram-negative
- Grupul III: bastonașe scurte, Gram variabile
- Grupul IV: bastonașe scurte, evoluând spre coci
- Grupul V: bastonașe cocoide, Gram-pozitive
- Grupul VI: coci, Gram-pozitivi sau Gram-negativi
- Grupul VII: bastonașe lungi, neîncorotate
- Grupul VIII: bastonașe sporulate

Tot din culturile pure obținute se efectuează și o serie de teste biochimice (reducerea nitraților, reducerea albastrului de metilen, producerea de indol, producerea de H_2S , producerea de acetoină, hidroliza gelatinei, a amidonului și a ureei) pentru a putea încadra bacteriile din sol în grupe fiziologice, iar pentru încadrarea lor în grupe nutriționale se ia în considerare capacitatea fiecărei culturi pure de a crește pe 7 tipuri de medii nutritive. Compoziția acestora este redată mai jos.

1. *Mediul bazal*: glucoză 1 g, K_2HPO_4 1 g, KNO_3 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, $CaCl_2$ 0,1 g, NaCl 0,1 g, $FeCl_2$ 0,01 g, apă distilată 1000 ml. Amestecul se fierbe, se filtrează și se corectează pH la 6,8. În final se sterilizează la $105^\circ C$, 20 minute.

2. *Mediul cu aminoacizi*: mediu bazal + cazaminoacizi în proporție de 0,4%.

3. *Mediul cu factori de creștere*: 1000 ml mediu bazal + cisteină 0,05 g, tiamină 100 μg , biotină 0,1 μg , piridoxină 200 μg , riboflavină 200 μg , inozitol 0,5 g, vitamina B_{12} 2 μg .

4. *Mediul cu aminoacizi + factori de creștere*: se amestecă în proporții egale mediul 2 cu mediul 3.

5. *Mediul cu extract de drojdii*: mediu bazal + extract de drojdii în proporție de 0,1%.

6. *Mediul cu extract de sol*: 750 ml mediu bazal + 250 ml extract de sol.

7. *Mediul cu extract de drojdii + extract de sol*: la mediul cu extract de sol se adaugă extract de drojdii în proporție de 0,1%.

Culturile pe mediul lichid se incubează timp de 5 zile la $28^\circ C$, iar intensitatea creșterii se determină turbidimetric.

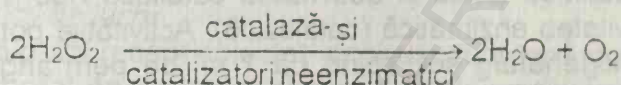
Pe baza rezultatelor obținute bacteriile din sol se grupează din punct de vedere nutrițional, după cum urmează:

1. bacterii cu necesități nutritive simple;
2. bacterii necesitând unul sau mai mulți aminoacizi;
3. bacterii care necesită factori de creștere;
4. bacterii care necesită aminoacizi și factori de creștere;

5. bacterii care necesită substanțe neidentificate din extractul de drojdii;
6. bacterii care necesită substanțe neidentificate din extractul de sol;
7. bacterii care necesită substanțe neidentificate atât din extractul de drojdii cât și din extractul de sol.

16.12. Determinarea activității catalazice a solului

Principiul metodei. La probe de sol active și inactivate termic se adaugă o soluție tampon și soluția apoasă a substratului (H_2O_2). După incubare, se determină cantitativ apa oxigenată nedescompusă. Catalaza și catalizatorii neenzimatici termostabili (oxizii de fier și de mangan, substanțele humice, mineralele argiloase) acționează conform reacției:



Material necesar

- Soluție tampon fosfat (pH 6,8). Se dizolvă 4,539 g de KH_2PO_4 și 5,938 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sau 11,946 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) în apă distilată fiartă și răcită și se completează la 500 ml.

- Soluție de H_2O_2 3% (greut./vol.). Se prepară în momentul folosirii din apă oxigenată concentrată (perhidrol ~30%). Pentru a determina concentrația perhidrolului comercial se iau din acesta 0,5 ml, se introduc într-un balon cotat de 100 ml și se completează cu apă distilată până la semn. Din această soluție se iau în 3-4 baloane Erlenmeyer de 100 ml câte 10 ml, la care se adaugă 10 ml H_2SO_4 4 N. Soluția obținută se titrează cu KMnO_4 0,05 N. 1 ml de permanganat 0,05 N corespunde la 0,85 mg H_2O_2 . Se calculează valoarea medie a consumului de permanganat la cele 3-4 titrări. Cu această cifră se poate calcula concentrația (greut./vol.) perhidrolului comercial.

- Soluție de H_2SO_4 4 N

- Soluție de KMnO_4 0,05 N

Tehnica de lucru

La 3 g sol activ sau inactivat termic se adaugă 10 ml soluție tampon și 2 ml soluție de H_2O_2 3%. Amestecul se agită și după 60 minute de incubare la temperatura camerei, se oprește reacția prin adăugarea a 10 ml soluție de H_2SO_4 4 N. Apoi se adaugă 78 ml apă distilată și se filtrează prin hârtie de filtru. Din filtratul clar se iau 25 ml și se introduc într-un balon Erlenmeyer de 100 ml. Se adaugă 2,5 ml

H_2SO_4 4 N și se titrează cu soluția de permanganat până la obținerea unei colorații slab roz.

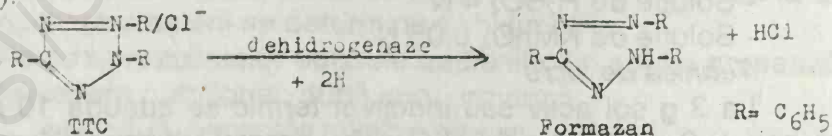
Drept martor se folosesc: a) probe cu sol, dar fără substrat; b) probe fără sol, dar cu substrat; c) probe fără sol și fără substrat.

Inactivarea probelor de sol se efectuează în felul următor: solul se umectează cu apă distilată în așa fel încât să fie acoperit cu un strat apos de 1-2 mm; se autoclavează la 120°C timp de o oră/zi, în 3 zile consecutive; în intervalele de 24 ore, probele se țin la temperatura camerei, iar după cea de a 3-a autoclavare probele se usucă la 110°C .

Exprimarea activității catalazice. Diferența între consumul de permanganat la proba martor cu substrat fără sol și probele active cu sol și substrat reprezintă activitatea catalitică totală (enzimatică + neenzimatică). Diferența între consumul de permanganat la proba martor cu substrat fără sol și probele inactivate termic cu adaos de H_2O_2 reprezintă activitatea catalitică neenzimatică. Diferența între activitatea catalitică totală și activitatea catalitică neenzimatică este egală cu activitatea enzimatică (catalazică). Activitățile pot fi exprimate în mg apă oxigenată/g sol, știind că 1 ml de permanganat 0,05 N corespunde la 0,85 mg H_2O_2 . Activitățile pot fi exprimate și în procente de descompunere a H_2O_2 .

16.13. Determinarea activității dehidrogenazice a solului

Principiul metodei. La sol se adaugă CaCO_3 (pentru neutralizarea acizilor care se formează în cursul incubării) și soluție de TTC (clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu) care servește ca acceptor al hidrogenului transferat de dehidrogenaze. Drept donatori de H servesc substanțele organice preexistente în sol sau/și glucoza adăugată. Toluene sau un alt antiseptic nu se adaugă, deoarece activitatea dehidrogenazică se datorește microflorei vii, capabile de proliferare. Substanțele antiseptice inhibă activitatea dehidrogenazică. În cursul incubării, TTC - care este un compus incolor - se reduce sub acțiunea H transferat de dehidrogenaze, la un compus roșu (formazan):



Formazanul se extrage cu solvenți organici (etanol, metanol, acetonă) și se determină fotocolorimetric. Cu cât este mai mare concentrația formazanului, cu atât este mai ridicată activitatea dehidrogenazică.

Material necesar

- CaCO_3 siccum, fin pulverizat;
- Soluție de TTC 3% (3 g TTC se dizolvă în apă distilată până la 100 ml; se păstrează în sticlă brună);
- Soluție de glucoză 3%;
- Etanol sau acetonă;
- Soluție etalon-mumă de formazan. Într-un balon cotat de 50 ml se introduc 0,5 ml soluție TTC 3%. Apoi se adaugă circa 0,5 g Zn pulverizat pentru reducerea TTC la formazan. Balonul se închide cu dopul de sticlă și se pune la întuneric. După câteva zile (2-5), la amestec se adaugă etanol absolut sau acetonă până la semnul balonului, pentru dizolvarea formazanului. Soluția roșie se decantează. Cei 50 ml de soluție (volumul ocupat de Zn, fiind foarte mic, se neglijează) corespund la 15 mg TTC, deci conțin 13,44 mg formazan. Soluția se păstrează în sticlă brună, la întuneric.

Tehnica de lucru

La 15 g sol recent colectat, apoi uscat la temperatura camerei (sau la un curent de aer rece) și cernut printr-o sită cu ochiuri de 1-2 mm, se adaugă 0,15 g CaCO_3 și se amestecă bine. Apoi se repartizează în 4 eprubete (3 g/eprubetă).

În cazul determinării activității *dehidrogenazice actuale*, la sol nu se adaugă substanțe organice (glucoză) drept donatori de H.

În vederea determinării, se va lucra cu 2 eprubete conținând câte 3 g sol + CaCO_3 . În eprubeta 1 se introduc 0,5 ml soluție de TTC și apă distilată fiartă și răcită. Cantitatea de apă trebuie să fie suficientă pentru a satura solul și a forma un strat subțire de lichid pe suprafața amestecului de reacție. Se notează volumul necesar de apă (V ml). De obicei, sunt necesari 1-1,75 ml apă. În eprubeta a doua - care servește drept martor cu sol, fără TTC - se adaugă 0,5 ml + V ml apă distilată fiartă și răcită.

În cazul determinării activității *dehidrogenazice potențiale*, la sol se adaugă glucoză, care - alături de substanțele organice preexistente în sol - va servi ca donator de H.

În vederea determinării, se va lucra cu alte 2 eprubete conținând câte 3 g sol + CaCO_3 . În eprubeta 3 se introduc 0,5 ml de soluție de TTC, 1 ml soluție de glucoză și (V-1) ml apă distilată fiartă și răcită. În eprubeta 4 - care servește drept martor cu sol, fără TTC - se adaugă 1 ml soluție de glucoză și (V-0,5) ml de apă distilată fiartă și răcită.

Nu este necesară prepararea probelor martor fără sol cu TTC, respectiv fără sol cu TTC + glucoză, deoarece din aceste probe nu se pot extrage substanțe colorate.

După prepararea amestecurilor de reacție, toate eprubetele se închid cu dopuri de plută și se pun la incubat, la 37°C pentru 24 ore. După incubare, în fiecare eprubetă se adaugă etanol sau acetonă, în doze succesive de 8-10 ml. După fiecare adăugare, conținutul eprubetelor se agită, apoi se lasă ca solul să se depună. În continuare, lichidul se filtrează în baloane cotate (sau cilindri gradati) de 50 ml, prin vată. După extragerea substanțelor colorate, pe vată se mai pune etanol sau acetonă până la dispariția totală a colorației roșii. Filtratul se completează până la 50 ml cu etanol sau acetonă și după agitare, se determină intensitatea colorației (la fotocolorimetrul FEK-M se lucrează cu filtrul albastru, iar la spectrofometru determinarea se face la 485 nm).

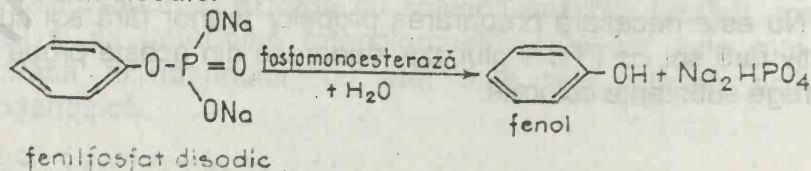
Pentru obținerea curbei etalon, din soluția etalon-mumă (conținând 13,44 mg formazan/50 ml) se iau 4-10 ml, din care se prepară diluții cu etanol sau acetonă. Gradul diluției este în funcție de intensitatea colorației roșii la extractele filtrate ale amestecurilor de reacție.

Exprimarea activității dehidrogenazice. Extincția extractului din eprubeta 1 reflectă cantitatea formazanului și a unor substanțe colorate preexistente în sol. La eprubeta 2, extincția extractului este dată numai de unele substanțe colorate preexistente în sol. Echivalentele în formazan ale extincțiilor se citesc de pe curba etalon. Diferența dintre echivalentele în formazan ale extractelor din eprubeta 1 și 2 caracterizează activitatea dehidrogenazică *actuală*, care se exprimă în mg formazan/10 g sol.

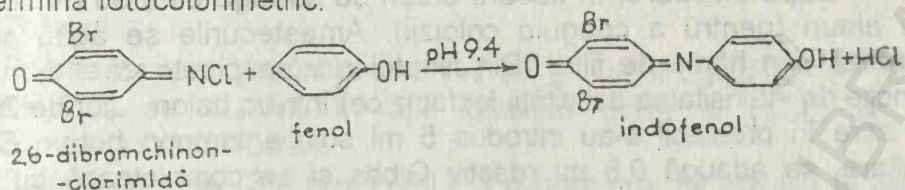
Extincția extractului din eprubeta 3 reflectă cantitatea formazanului produs în prezența glucozei adăugate și cantitatea unor substanțe colorate preexistente în sol și produse în prezența glucozei. La eprubeta 4, extincția extractului este dată numai de unele substanțe colorate preexistente în sol și formate în prezența glucozei. Echivalentele în formazan ale extincțiilor se citesc de pe curba etalon. Diferența dintre echivalentele în formazan ale extractelor din eprubetele 3 și 4 caracterizează activitatea dehidrogenazică *potențială*, care se exprimă - ca și cea actuală - în mg formazan/10 g sol.

16.14. Determinarea activității fosfatazice a solului

Principiul metodei. La sol se adaugă toluen (pentru a preveni proliferarea microorganismelor) și soluția apoasă a substratului enzimatic (fenilfosfat disodic). În cursul incubării, fenilfosfatul se scindează hidrolitic sub acțiunea fosfomonoesterazei, producându-se fenol și fosfat disodic:



Fenolul reacționează cu 2,6-dibromchinon-clorimidă (reactivul Gibbs), formându-se un compus albastru (un indofenol) care se determină fotocolorimetric:



Cu cât este mai mare concentrația indofenolului, cu atât va fi mai ridicată activitatea fosfatazică.

Material necesar

- Toluen

- Soluție de fenilfosfat disodic 0,5%. Se dizolvă 0,5 g fenilfosfat disodic în circa 80 ml apă distilată. Se controlează pH soluției. Dacă acesta nu este 7, se ajustează la această valoare, apoi soluția se completează cu apă distilată până la 100 ml.

- Soluție de alaun 0,3%

(se folosește alaun de amoniu $\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).

- Soluție tampon borax (pH 9,4). Se dizolvă 14,2 g borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) în circa 400 ml apă distilată fiartă și răcită. Apoi soluției i se adaugă 41 ml soluție de NaOH N și se completează cu apă distilată fiartă și răcită, până la 500 ml.

- Soluție de 2,6-dibromchinon-clorimidă (reactiv Gibbs). Se dizolvă 0,125 g de 2,6-dibromchinon clorimidă în 50 ml etanol 96° prin agitare (circa 30 minute). Lichidul se filtrează prin hârtie de filtru, obținându-se o soluție clară. Soluția se păstrează în sticlă brună la frigider și poate fi folosită până când nu se brunifică (până când rămâne galbenă, circa 12 zile).

- Soluție etalon-mumă de fenol. Se dizolvă 1 g fenol p.a. în HCl N până la 1000 ml. Soluția se păstrează în sticlă brună la frigider. În momentul analizei, se iau 5 ml din soluția etalon-mumă și se diluează cu apă distilată până la 100 ml. Această soluție - care se va folosi pentru obținerea curbei etalon - conține 50 μg fenol/ml.

Tehnica de lucru

Într-un balon cu fund plat de 100 ml se cântăresc 2,5 g sol uscat la temperatura camerei și cernut printr-o sită cu ochiuri de 2 mm. Se adaugă apoi 10 ml soluție de fenilfosfat disodic. Drept martor servesc: o probă cu sol fără substrat (cu 10 ml apă distilată în locul soluției de substrat) și o probă fără sol, numai cu substrat. Amestecurile de reacție se agită, baloanele se închid cu dopuri de cauciuc și se pun la incubat la 37°C pentru 2 ore. Dacă incubarea trebuie prelungită peste 2 ore, din cauză că activitatea este foarte mică, atunci la proba de sol se adaugă

2 ml toluen și după agitare și așteptare timp de 15 minute, se va adăuga soluția de substrat.

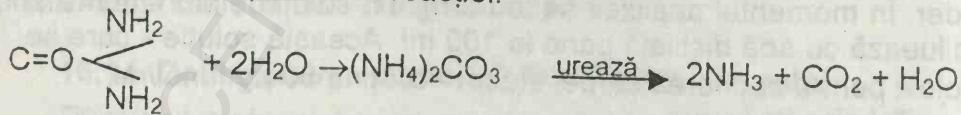
După incubare, în fiecare balon se adaugă câte 50 ml soluție de alaun (pentru a coagula coloizii). Amestecurile se agită și se filtrează prin hârtie de filtru. Din filtratul clar se pipetează 1-5 ml (în funcție de intensitatea activității fosfataze) într-un balon cotate de 25 ml în care în prealabil s-au introdus 5 ml soluție tampon borax. După agitare, se adaugă 0,8 ml reactiv Gibbs și se completează cu apă distilată până la semn (25 ml). Se agită și după 30 minute de așteptare, soluția albastră se fotocolorimetrează. Limitele determinării sunt: 10-120 μg fenol/25 ml soluție de fotocolorimetrat.

Pentru obținerea curbei etalon, din soluția de fenol conținând 50 μg fenol/ml se iau 0; 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,4 ml și se introduc în baloane cotate de 25 ml, în care în prealabil s-au adăugat 5 ml soluție tampon borax. După agitare, se adaugă 0,8 ml reactiv Gibbs și se completează apoi cu apă distilată la semn. Se agită și după 30 minute de așteptare, soluțiile se fotocolorimetrează folosind filtrul roșu cu 597 nm. Aceste soluții conțin 0; 10; 25; 50; 75; 100; 120 μg fenol/25 ml.

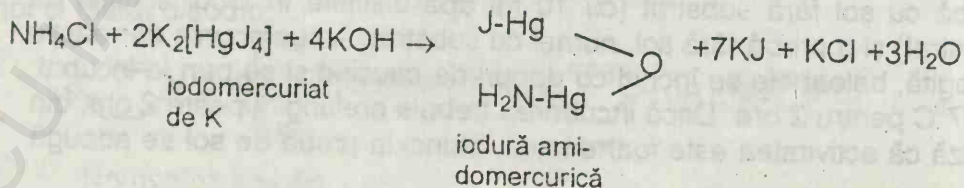
Exprimarea activității fosfataze. De pe curba etalon se citesc cantitățile de fenol din filtratele analizate. Cantitatea de fenol, evidențiată din probele cu sol și substrat caracterizează intensitatea activității fosfataze. Această valoare trebuie modificată cu cantitățile de fenol găsite în probele martor. Activitatea fosfatazică se exprimă în mg fenol/2,5 g sol. Ea poate fi exprimată și în mg fenol/100 g sol, precum și în procente de hidroliză.

16.15. Determinarea activității ureazice a solului

Principiul metodei. La sol se adaugă toluen (pentru a preveni proliferarea microorganismelor) și soluția apoasă a substratului enzimatic (uree). În cursul incubării, ureea se scindează hidrolitic sub acțiunea ureazei, conform reacției:



Amoniul format se extrage cu o soluție de KCl și se determină cantitativ prin nesslerizare și colorimetrare:



Cu cât este mai mare concentrația iodurii amidomercurice, cu atât este mai ridicată activitatea ureazică.

Reactivi necesari.

- *Toluen*
- *Soluție tampon fosfat* pH = 6,7 • 7,66 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 7,76 g KH_2PO_4 se dizolvă în apă distilată fiartă și răcită și se completează la 100 ml.
- *Soluție de uree* (3% greut./vol.). 3 g uree p.a. se dizolvă în circa 80 ml apă distilată și se fierbe timp de câteva minute, apoi se răcește și se completează cu apă distilată fiartă și răcită la 100 ml.
- *Soluția de KCl 2 M*. 74,560 g KCl se dizolvă în apă distilată fiartă și răcită și se completează la 500 ml.
- *Soluția de sare Seignette* (Tartrat dublu de K și Na = $\text{KNa}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (50% greut./vol.). 50 g sare Seignette se dizolvă în apă distilată fiartă și răcită și se completează la 100 ml.
- *Soluția Nessler*. Se mojarază 10 g HgJ_2 cu 3-4 ml apă distilată, până când se obține o pastă. La pastă se adaugă 5 g KJ și, după amestecare, se toarnă în doze succesive în total 100 ml soluție de KOH 20% (greut./vol.) rece. Pasta se amestecă continuu cu soluția de KOH. Se obține o soluție opalescentă. Soluția se păstrează în sticlă brună, iar după câteva zile se centrifughează (4000 turații timp de 30 minute). Supernatantul clar se decantează într-o sticlă brună și reprezintă reactivul Nessler.
- *Soluția etalon*. 2,968 g NH_4Cl se dizolvă în apă distilată fiartă și răcită și se completează la 1000 ml. Din soluția etalon astfel preparată se iau 5 ml și se diluează cu apă distilată fiartă și răcită până la 500 ml. Un ml din această soluție conține 10 μg NH_4 .

Tehnica de lucru

În baloane de 100 ml cu fund plat se cântăresc 5 g sol din fiecare tip de sol. În cazul unei incubări mai mari de două ore la sol se adaugă 2 ml tolueen. După umectare și așteptare 15 minute, în fiecare balon se pipetează 5 ml soluție tampon și 5 ml soluție de uree. Drept martor servesc: a. o probă cu sol, dar fără substrat enzimatic (cu 5 ml apă distilată în locul celor 5 ml soluție de uree); b. o probă fără sol, numai cu substrat enzimatic (soluție de uree); c. o probă numai cu apă, fără sol și fără uree (vezi schema din tabelul 19).

Tabelul 19

Compoziția amestecurilor de reacție pentru determinarea activității ureazice a solului

Nr. probei	Denumirea solului	Cantit de sol (g)	Toluen (ml)	Soluție tampon (ml)	Soluție uree (ml)	Apă distilată (ml)	Incu bare
1	Cernoziom levigat	5	2	5	5	-	24 ore-
2	idem	5	2	5	-	5	idem
3	Sol aluvial	5	2	5	5	-	idem
4	idem	5	2	5	-	5	-
5	Fără sol	-	2	5	5	-	idem
6	idem	-	2	5	-	5	-

După incubare, în fiecare balon se adaugă 25 ml soluție de KCl 2M. Se agită și se filtrează prin hârtie de filtru. Din filtratele obținute se iau 0,5-5 ml, li se adaugă apă distilată până la 40 ml, 2 ml soluție de sare Seignette, 1 ml reactiv Nessler și se mai adaugă apă distilată până la 50 ml (vezi și schema din tabelul 20).

Tabelul 20

Prelucrarea amestecurilor de reacție după incubare

Nr. probei	KCl 2M (ml)	Filtrat (ml)	Apă dist. (ml)	Sare Seignette (ml)	Reactiv Nessler (ml)	Apă dist. (ml)	Ex-tinc-tie
1	25	1	40	2	1	ad 50	
2	25	1	40	2	1	ad 50	
3	25	1	40	2	1	ad 50	
4	25	1	40	2	1	ad 50	
5	25	1	40	2	1	ad 50	
6	25	1	40	2	1	ad 50	

Soluția colorată în galben-portocaliu se fotocolorimetrează imediat, lucrând cu filtrul albastru (445 nm). Etalonarea aparatului se face față de apă distilată. Pentru obținerea curbei etalon, din soluția etalon diluată (conținând 10 μg NH_4/ml) se iau: 1; 2,5; 5; 10; 20; 30 și 40 ml. Se completează fiecare probă etalon cu apă distilată până la 40 ml. Apoi se adaugă 2 ml soluție Seignette, 1 ml reactiv Nessler și apă distilată până la semn (50 ml). Soluțiile se agită după adăugarea fiecărui reactiv. (vezi și schema din tabelul 21).

Obținerea curbei etalon

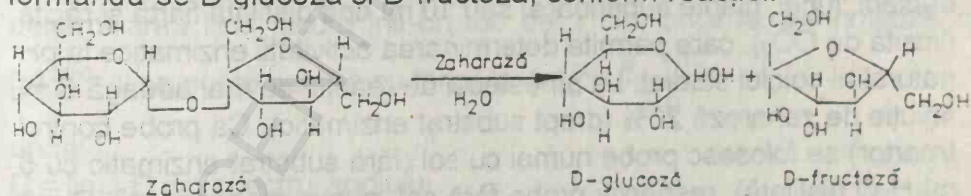
Nr. probei etalon	Sol. etalon diluată (ml)	$\mu\text{g NH}_4$	Apă dist. (ml)	Sol.sare Seignette (ml)	Reactiv Nessler (ml)	Apă dist. (ml)	Ex-tincție
E ₁	-	0	40	2	1	ad 50	
E ₂	1	10	39	2	1	ad 50	
E ₃	2,5	25	37,5	2	1	ad 50	
E ₄	5	50	35	2	1	ad 50	
E ₅	10	100	30	2	1	ad 50	
E ₆	20	200	20	2	1	ad 50	
E ₇	30	300	10	2	1	ad 50	
E ₈	40	400	-	2	1	ad 50	

După prepararea probelor etalon se trece la citirea extincțiilor la fotocolorimetru sau Specol ca și în cazul probelor experimentale. Pe baza extincțiilor și a concentrației în $\mu\text{g NH}_4$ se construiește curba etalon, de pe care se citesc valorile pentru fiecare probă experimentală.

Exprimarea activității ureazice. Activitatea ureazică se exprimă în mg de $\text{NH}_4/100$ g sol sau în procente de hidroliză.

16.16. Determinarea activității zaharazice (=invertazice) a solului

Principiul metodei. La sol se adaugă toluen (pentru a preveni proliferarea microorganismelor), soluție tampon sau apă distilată și soluția apoasă a substratului enzimatic (zaharoză). În cursul incubării, zaharoza se scindează hidrolitic sub acțiunea zaharazei(=invertazei), formându-se D-glucoză și D-fructoză, conform reacției:



Zaharoza rotește planul luminii polarizate spre dreapta (este dextrogiră). Rotația ei specifică $[\alpha]_D^{20^\circ} + 66,5^\circ$. D-glucosa este de asemenea dextrogiră, rotația ei specifică $[\alpha]_D^{20^\circ}$ fiind de $+52,5^\circ$. D-fructoza în schimb este puternic levogiră, $[\alpha]_D^{20^\circ} = -92,3$. În consecință, zahărul invertit este levogir, $[\alpha]_D^{20^\circ} = -20^\circ$. Soluția inițial dextrogiră datorită zaharozei, devine în prezența zaharazei mai puțin dextrogiră sau chiar levogiră (inversie). Cu cât este mai mare diferența între rotația

inițială (rotația în absența zaharazei) și rotația observată după incubare (în prezența zaharazei) cu atât va fi mai mare (mai intensă) activitatea zaharazică.

Reactivi necesari

- Toluen p.a.
- *Soluție de zaharoză 20%*: 20 g zaharoză p.a. se dizolvă în cca 80 ml apă distilată, apoi soluția se fierbe pe o sită de azbest timp de 1-2 minute; după răcire se completează la semn (100 ml) cu apă distilată fiartă în prealabil și răcită.
- *Soluție tampon acetat 2M (pH=5,5)*; se prepară din două soluții:
 - a) 120 ml acid acetic glacial se dizolvă în apă distilată fiartă și răcită până la 1000 ml;
 - b) 272,12 g acetat de Na ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) se dizolvă în apă distilată, fiartă și răcită, până la 1000 ml. Soluția tampon se obține în momentul analizei prin amestecarea soluțiilor a și b, în proporție de 1:8 (o parte soluția a și 8 părți soluția b).
- Acetat de Pb [$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$], fin pulverizat

Aparatură

Polarimetru cu lampă de Na sau Polamat.

Tehnica de lucru

Solul, colectat de la 5-15 cm adâncime (în general), respectiv de la alte adâncimi, se usucă cât mai repede, într-un strat întins subțire, cu ajutorul unui ventilator. Din fiecare sol se cântăresc câte 10 g în baloane de 100 ml, cu fund plat, după care se adaugă 2 ml toluen. Se agită pentru umezirea completă a solului după care se lasă în repaus 15 minute. Se adaugă apoi 10 ml tampon acetat [pH=5,5] (acest pH este valoarea medie a pH zaharazei de origini diferite:

bacterii, fungi, plante superioare) sau 10 ml apă distilată fiartă și răcită (lipsită de CO_2), care permite determinarea activității enzimatice la pH natural al solului studiat. La amestecul de reacție se mai adaugă 5 ml soluție de zaharoză 20% (drept substrat enzimatic). Ca probe control (martor) se folosesc probe numai cu sol (fără substrat enzimatic cu 5 ml H_2O distilată), respectiv probe fără sol, numai cu zaharoză. După agitarea probelor pentru omogenizarea amestecurilor de reacție, baloanele închise se pun la incubat, în termostat la 37°C . Incubarea durează de obicei 24 de ore (la solurile cu activități enzimatice reduse poate dura 48-72 ore). După incubare, la amestecurile de reacție se adaugă 25 ml apă distilată fiartă și răcită și 2,5 g acetat de Pb (pentru oprirea reacției enzimatice și coagularea coloizilor din sol, în scopul obținerii unor filtrate clare). După agitare, pentru dizolvarea acetatului,

amestecurile de reacție se filtrează prin hârtie de filtru. Filtratele se polarimetrează. Din fiecare filtrat se umple tubul polarimetrului. Se citește puterea rotatoare, lucrând cu tubul de 2 dm și cu lampa de sodiu, la temperatura camerei. La Polamat se înregistrează puterea rotatoare.

Exprimarea activității zaharazice. Activitatea zaharazică se exprimă în diferență de rotație sau în procente de hidroliză.

Diferența de rotație se obține scăzând rotația probei cu sol din rotația probei fără sol (numai cu substrat enzimatic). Diferența de rotație se notează cu $\Delta\alpha^\circ$, rotația filtratului cu sol și substrat enzimatic cu α_t° , iar cea a filtratului numai cu substrat enzimatic cu α_0° . Așadar $\Delta\alpha^\circ = \alpha_0^\circ - \alpha_t^\circ$.

Hidroliza procentuală (=P) se calculează cu ajutorul formulei:

$$P = \frac{100 \cdot \Delta\alpha^\circ}{\alpha_0^\circ \cdot 1,3157}$$

Activitatea zaharazică se calculează separat pentru probele cu soluție tampon, respectiv pentru probele cu apă distilată în locul soluției tampon.

Explicații suplimentare

Demonstrația activității optice se poate efectua cu ajutorul polarimetrului. Prezența atomului de carbon asimetric determină asimetria întregii molecule și datorită acestei asimetrie moleculare monozaharidele deviază planul luminii polarizate.

Rotația specifică a unei substanțe fiind definită ca rotația exprimată în grade a unui gram de substanță dizolvată într-un litru de apă, determinarea fiind făcută într-un tub de 1 dm lungime. Se notează cu

$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}}$ și se poate calcula cu formula: $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot g}$

unde:

D = linia D din spectrul sodiului

α = rotația observată în grade

g = gram substanță dizolvată în 100 ml de soluție

l = lungimea tubului în dm

Dacă se determină rotația specifică, se poate calcula cantitatea în g de substanță din soluție după formula:

$$g = \frac{\alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20^\circ\text{C}}}$$

Valoarea g x 100 dă procentul substanței din soluție.

Prezentăm mai jos rotația specifică a unor glucide (concentrație 10%, la temperatura de 20°C):

D-glucopza	+ 52,5°
D-fructoza	-92,3°
D-galactoza	+81,5°
D-manoza	+14,2°
D-xiloza	+19°
L-arabinoza	+104,5°
ramnoza	+9,0°
zaharoza	+66,5°
lactoza	+52,5°
maltoza	+137°
rafinoza	+104,0°
amidon	+195°
dextrina	+196°
glicogen	+197°

16.17.Evidențierea unor oligaze și poliaze din sol

Principiul metodei. La sol se adaugă toluen (pentru a preveni proliferarea microorganismelor) și soluția apoasă a substratului enzimatic (zaharoză, maltoză, celobioză, lactoză, amidon, dextran și inulină). În cursul incubării, substratul se scindează hidrolitic sub acțiunea enzimei specifice, conform reacțiilor sumare de mai jos:

1. zaharoză $\xrightarrow[+H_2O]{\text{zaharază}}$ glucoză+fructoză;
2. maltoză $\xrightarrow[+H_2O]{\text{maltază}}$ 2 glucoză;
3. celobioză $\xrightarrow[+H_2O]{\text{celobiază}}$ 2 glucoză;
4. lactoză $\xrightarrow[+H_2O]{\text{lactază}}$ glucoză + galactoză;
5. amidon $\xrightarrow[+H_2O]{\text{enzime amilolitice}}$ oligozaharide, dizaharide (maltoză), glucoză,
6. dextran $\xrightarrow[+H_2O]{\text{dextranază}}$ oligozaharide, dizaharide (izomaltoză), glucoză,
7. inulină $\xrightarrow[+H_2O]{\text{inulază}}$ oligofructozide, difructozide, fructoză.

Prođușii hidrolitici reducători se evidențiază prin metoda de cromatografie pe hârtie. Cu cât este mai intens spotul produșilor hidrolitici, cu atât este mai mare activitatea oligazelor și poliazelor.

Reactivi necesari

- Toluen
 - Soluție de substrat 2%. Se cântărește 1 g din fiecare substrat. Substratul cântărit se pune într-un balon cotate. Se adaugă 5 ml apă distilată. Se agită și se încălzește pentru a facilita dizolvarea substratului și pentru a inactiva urmele de enzime eventual prezente în preparatul comercial de substrat. Final, baloanele se răcesc la jetul de apă de robinet. Conținutul lor se toarnă în cilindri gradați. Baloanele se spală cu apă. Lichidul de spălare se toarnă tot în cilindri. Final, soluția din cilindri se completează cu apă distilată până la 50 ml.
 - Soluție de glucoză 2%. Se prepară ca și soluția de substrat.
 - Sistemul de dizolvanți. Are următoarea compoziție: *n*-propanol-acetat de etil - apă 6:1:3 vol./vol./vol.
 - Reactivi pentru revelare.
 - I. Detectarea zaharurilor reducătoare (care conțin o grupare carbonilică liberă):
 - a). Soluție saturată de AgNO_3 .
 - b) Acetonă.
 - c). Soluție de NaOH 0,2 N. d) Fixator fotografic: 2 g metabisulfat de K și 20 g tiosulfat de Na se dizolvă în apă distilată până la 100 ml.
 - II. Detectarea cetozelor libere și combinate (fructoză, fructani).
Reactiv cu uree și acid o-fosforic: 1 g uree, 25 ml alcool etilic 96° și 5 ml acid o-fosforic 89%.
- Sunt necesare și hârtii cromatografice circulare ($\phi=18,5$ cm) pregătite pentru câte 6 probe.

Tehnica de lucru

În eprubete se cântăresc câte 3 g de sol uscat la temperatura camerei și cernut printr-o sită cu ochiuri de 1-2 mm. Se pipetează în fiecare eprubetă câte 2 ml toluen. Se așteaptă 15 minute. Apoi se adaugă 10 ml soluție de substrat. Drept martor servesc: a) o probă fără sol, numai cu toluen și cu 10 ml soluție de substrat; b) o probă cu sol, cu toluen, dar fără substrat (cu 10 ml apă distilată în locul celor 10 ml soluție de substrat);

Compoziția amestecurilor de reacție este redată în tabelul 22

După prepararea amestecurilor de reacție, eprubetele închise cu dopuri de cauciuc se pun la incubat, la 37°C/7 zile.

După incubare se trece la analiza cromatografică a amestecurilor de reacție. În acest scop, din faza apoasă a amestecurilor de reacție se ia lichid cu o pipetă Pasteur. O picătură de lichid se pune pe punctul de start de pe hârtia cromatografică. Pe o hârtie se examinează probele 1-8, iar pe altă hârtie - probele 9-16. După uscarea picăturilor, hârtiile se pun în aparatul de cromatografie pentru dezvoltare (tanc de dezvoltare), în sistemul de dizolvanți. Hârtiile dezvoltate se scot din aparat și se usucă cu un curent de aer rece produs de un aparat tip "foen". Apoi, se trece la revelare.

I. Revelarea zaharurilor reducătoare cuprinde mai multe operații:

- a) La 20 ml acetonă se adaugă 0,1 ml soluție saturată de AgNO_3 . Cristalele de AgNO_3 , care precipită se dizolvă prin adăugarea câtorva picături de apă distilată. Soluția astfel preparată se toarnă într-o cutie de sticlă sau într-o cutie emailată. În această soluție se iversează hârtiile cromatografice dezvoltate și uscate. Hârtiile apoi se usucă cu un curent de aer rece.
- b) Hârtiile se iversează în soluția de NaOH 0,2N. Apar spoturile brune sau negre ale zaharurilor reducătoare.
- c) Hârtiile umede se transpun în fixatorul fotografic, în care fondul hârtiei devine alb.
- d) Hârtiile se spală în apă de robinet, apoi se lasă să se usuce la întuneric, între foi de hârtie de filtru.

II. Revelarea cetozelor libere și combinate cuprinde etapele:

- a) pulverizarea (cu ajutorul unui pulverizator) reactivului cu uree și acid o-fosforic într-un strat subțire, uniform pe suprafața cromatogramei;
- b) uscarea cromatogramelor umede în etuvă la 110°C , 5-10 minute (așezate pe marginile unui germinator de porțelan sau suspendate de raftul etuvei cu agrafe), până apar spoturile (=petele) de culoare albastră.

Se trece la examinarea spoturilor. Examinarea poate fi efectuată încă înaintea uscării cromatogramelor.

În cursul examinării se compară spoturile de la probele experimentale cu cele de la probele martor.

Tabelul 22

Compoziția amestecurilor de reacție pentru studierea unor oligaze și poliaze din sol

			Soluție de:								
Nr. probei	Con- tit. sol g	To- lu- en ml	za- ha- roză ml	mal- toză ml	celo- bio- ză ml	lac- toză ml	ami- don ml	glico- gen ml	dex- tran ml	inu- lină ml	Apă dist. ml
1	3	2,5	10	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	2,5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
3	3	2,5	-	10	-	-	-	-	-	-	-
4	-	2,5	-	5	-	-	-	-	-	-	-
5	3	2,5	-	-	10	-	-	-	-	-	-
6	-	2,5	-	-	5	-	-	-	-	-	-
7	3	2,5	-	-	-	10	-	-	-	-	-
8	-	2,5	-	-	-	5	-	-	-	-	-
9	3	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	10
10	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	5
11	3	2,5	-	-	-	-	10	-	-	-	-
12	-	2,5	-	-	-	-	5	-	-	-	-
13	3	2,5	-	-	-	-	-	10	-	-	-
14	-	2,5	-	-	-	-	-	5	-	-	-
15	3	2,5	-	-	-	-	-	-	10	-	-
16	-	2,5	-	-	-	-	-	-	5	-	-
17	3	2,5	-	-	-	-	-	-	-	10	-
18	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	5	-
19	3	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	10
20	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	5

16.18. Determinarea activității proteazice a solului

Principiul metodei. Probele de sol se tratează cu toluen, soluție tampon și soluție de gelatină. Se incubează la 37°C, 16-24 ore. Filtratul obținut se tratează cu ninhidrină la cald (fierbere). În prezența aminoacizilor apăruți din gelatină sub acțiunea proteazei apare o colorație albastră, a cărei intensitate se citește la 578 nm și apoi se calculează cantitatea de amino-N.

Material necesar.

- Toluen, HCl sol. 0,1N
- NaCl
- Tampon TRIS

a). pentru soluri neutre (pH=6-7,5):

370 ml HCl 0,1 N + 3,65 g NaCl + 6,05 g Tris + apă distilată ad 1000 ml (pH = 7,6);

b) pentru soluri acide (pH=4,5):

320 ml HCl 0,1N + 3,65 g NaCl + 6,05 g Tris + apă distilată ad 1000 ml (pH = 7,85);

c) pentru soluri puternic acide (pH sub 4,5):

270 ml HCl 0,1 N + 3,65 g NaCl + 6,05 g Tris + apă distilată ad 1000 ml (pH=8);

d) pentru soluri carbonatate (pH=7,5):

410 ml HCl 0,1 N + 3,65 g NaCl + 6,05 g Tris + apă distilată ad 1000 ml (pH = 7,4)

- Soluție de gelatină 2%:

5 g de gelatină se introduc într-un balon de 250 ml și se dizolvă în 150 ml tampon Tris (soluțiile a,b,c,d), se încălzește la 50°C până se dizolvă complet și apoi se completează cu soluțiile tampon Tris respective până la 250 ml (se poate păstra 1-2 zile la rece)

- Reactiv cu ninhidrină:

200 mg ninhidrină se introduc într-un balon care conține 20 ml apă distilată și se dizolvă prin încălzire, se adaugă apoi 40 ml tampon fosfat Sörensen (pH= 6,9) și se completează cu apă distilată până la 100 ml.

- Tampon fosfat Sörensen:

KH_2PO_4 M/15 - 50 ml + Na_2HPO_4 M/15 - 50 ml

KH_2PO_4 M/15 = 9,078 g; KH_2PO_4 + H_2O dist. ad. 1000 ml

Na_2HPO_4 M/15 = 11,876 g Na_2HPO_4 + H_2O dist. ad. 1000 ml

- Soluție etalon mumă:

267,9 mg glicină (glicocol) se dizolvă în 100 ml apă distilată (1 ml = 0,5 mg amino-N) (se poate păstra 1-2 săptămâni la 4°C, după ce s-au adăugat câteva picături de toluen)

Tehnica de lucru

Se cântăresc câte 10 g sol, în baloane de 100 ml, din fiecare tip de sol. Se adaugă 1,5 ml toluen, se amestecă cu grijă prin scuturare și se lasă să stea în repaus 15 minute (baloanele fiind închise cu dopuri de cauciuc). În fiecare balon se adaugă apoi 20 ml soluție de gelatină 2%. Se agită bine. Se introduc în termostată, la 37°C. Vor fi montate variante control (martor), numai cu sol (fără substrat enzimatic) respectiv numai cu gelatină 2% (fără sol).

După incubare, în baloane se adaugă apă distilată încălzită la 38°C până la semn (100 ml). Se agită bine și se filtrează prin hârtie de

filtru (filtru creț). Din filtrat se pipetează câte 2 ml în 2 eprubete pentru fiecare balon cu proba de analizat. Filtratele trebuie să fie clare. În continuare, în fiecare eprubetă se adaugă 5 ml ninhidrină și eprubetele se fierb în baia de apă 30 de minute (din momentul când apa din baie a început să fiarbă). Apoi eprubetele se răcesc (apa din vas să ajungă până la nivelul lichidului din eprubetă). Conținutul unei eprubete se transpune într-un cilindru gradat de 100 ml, prin clătirea repetată a eprubetei după care se completează la semn (100 ml) cu apă distilată. Apoi se omogenizează. Soluțiile colorate în albastru se fotocolorimetrează, în cuvele de 1 cm, la 578 nm (filtru roșu), comparativ cu probele etalon. Colorația rămâne stabilă timp de câteva ore.

Pentru curba etalon se pipetează în baloane de 100 ml, 2, 3, 5, 7 ml din soluția mumiă de glicină, după care se procedează ca și în cazul probelor experimentale. Adică din fiecare balon se ia într-o eprubetă 2 ml, se adaugă apoi 5 ml ninhidrină și eprubetele se fierb 30 de minute pe baia de apă. După răcire, apoi transpunere în cilindri gradați de 100 ml, și omogenizare, se fotocolorimetrează la 578 nm. Curba etalon este liniară până la valori ale extincțiilor de 0,800 = circa 4 mg amino-N.

Pe baza curbei etalon se citesc valorile pentru fiecare extincție în parte, calculându-se cantitatea de amino-N în 10 g sol.

Indicații speciale

În cazul când extincțiile sunt sub 0,100 se vor lua în loc de 2 ml, 4 ml de filtrat.

La uscarea solurilor proaspăt colectate (cu umiditate naturală) se poate înregistra o puternică micșorare a activității proteazice (cu circa 30% în cazul solurilor cu activități enzimatice intense); respectiv cu 40-70% în cazul solurilor cu activități enzimatice reduse). Se recomandă păstrarea (depozitarea) probelor de sol la temperatura camerei în pungi de plastic timp de maximum 2 luni, perioadă în care nu se înregistrează nici o diminuare sensibilă a activității enzimatice (după Beck, 1978).

Activitatea proteazică poate fi apreciată pe baza rezultatelor obținute în strânsă corelație cu coeficienții de bonitare a unor tipuri de sol, redati în tabelul 23

Tabelul 23

Coeficienții de bonitare ai activității proteazice a solului

Activitatea proteazică (mg amino-N/10 g sol)	Trepte de activitate
0,1 - 1,5	Foarte slabe - slabe
1,5 - 3,5	Medii
3,5 - 5,0	Peste medii
>5,0	Foarte înalte

16.19. Determinarea biomasei microbiene

Microorganismele există în sol într-o mare diversitate și densitate. Bacteriile și ciupercile (micromicetele) reprezintă masa microorganismelor. Protozoarele și algele apar în număr mai mic. Cantitatea de C din biomasă, din carbonul organic al unui sol se estimează la 1-3% (Sparling, 1985). Cercetări comparate privind biomasa, realizate pe soluri exploatate în Bavaria, au arătat că procentul masei microbiene în cadrul substanței organice a solului reprezintă 1-5% în solurile arabile și 28% în pajiști naturale (Beck și colab., 1992). Pe baza determinărilor de biomasă realizate cu ajutorul analizei matematice a unor curbe de respirație, 2-30% din întreaga biomasă se găsește în stare activă (Van de Wert și Verstracte, 1987).

Capacitatea microflorei solului este multiplă și diferită în ceea ce privește fertilitatea solului și funcționarea ecosistemelor:

- capacitatea de degradare; mineralizarea unor substanțe vegetale, animale, microbiene și a unor substanțe organice sintetice, mobilizarea substanțelor de nutriție și microelemente;
- puterea de sinteză; formarea biomasei microbiene, sinteza substanțelor de aglomerare (agregare), imobilizarea substanțelor nutritive.

Pentru determinarea biomasei microbiene se utilizează diferite metode:

1. determinări microscopice ale numărului de germeni;
2. numărarea (determinarea) germenilor pe medii nutritive solide și lichide;
3. metode de fumigație – incubare, metode de fumigație – extracție și respirația indusă de substrat;
4. determinarea ATP, acidului muramic, D-alaninei, acidului diaminopimelic (DAP), chitinei sau altor glucozamine, ergosterol, acizi nucleici, fosfolipide și lipopolizaharide;
5. măsurarea ratei de sinteză a ADN (H^3 -timidină), modul de incorporare a $H_3P^{32}O_4$ și a acetat C^{14} ;
6. analize spectrometrice de masă, cu izotopi stabili.

O privire generală asupra literaturii de specialitate legate de diferite posibilități metodologice pentru cuantificarea microorganismelor din sol a fost elaborată de Jenkinson și Ladd (1981), Tunlid și White (1992) și alții.

Determinările de biomasă sunt legate de multe alte probleme. Determinările microscopice directe, de numărare sau de determinare

a numărului de germeni prin metode culturale (metoda culturilor în plăci, metoda diluțiilor prin numărul cel mai probabil) se referă doar la un procent scăzut, necunoscut, din biomasa microbiană totală din cauza apariției frecvente a unor agregate celulare, datorită adsorbției foarte diferite a microorganismelor la particulele de sol și datorită imposibilității de creștere a tuturor microorganismelor pe medii nutritive.

Determinările microscopice directe ale numărului de germeni nu permit diferențierea biomasei vii de cea moartă. Metodele fiziologice sunt mai reproductibile în ceea ce privește determinarea numărului de germeni și se pretează bine pentru cercetări comparate.

Transformarea mărimilor măsurate în greutatea biomasei nu este fără rezerve și necesită cercetări ulterioare. O concluzie directă asupra biomasei active evidențiată în laborator referitoare la capacitatea de schimb de substanțe în soluri necultivate nu este suficient de riguroasă. Nici determinarea numărului de germeni viabili, nici determinarea fiziologică a numărului de germeni, nu ia în calcul (în considerare) cantitatea relativ mare de biomasă inactivă (în stare de repaus) existentă în condiții naturale.

16.19.1. Determinarea numărului de germeni bacterieni

În cadrul microorganismelor din sol bacteriile se pretează foarte bine la estimarea lor cantitativă prin numărare. Se va ține cont în acest caz că bacteriile nu sunt repartizate uniform în sol și că chiar într-un spațiu relativ îngust (pe o suprafață mică) pot să apară diferențe mari. Pe lângă aceasta biomasa este dependentă de bacterii care la rândul lor sunt dependente de condițiile fizice, chimice, schimbătoare pe perioade scurte, ce duc la fluctuații puternice. Conținutul în bacterii poate fi estimat fie prin numărare microscopică directă sau prin metode culturale indirecte. În cazul ultimei metode este necesar ca să se dezvolte din germenii conținuți de probă colonii bacteriene. Numărul total de bacterii apreciate prin numărare directă poate fi cu 1-2 grade de mărime (grade zecimale) mai mare decât numărul de celule vii determinate prin metode culturale, deoarece nu s-au luat în considerare bacteriile moarte sau cele care nu se pot înmulți. În cazul numărărilor microscopice se includ toate acele microorganisme care nu se dezvoltă în mediul nutritiv folosit la metodele culturale sau în condițiile de incubare alese.

Aici se încadrează spre exemplu grupe importante cum ar fi bacteriile fixatoare de azot, bacteriile nitrificatoare, bacteriile celololitice și bacteriile anaerobe.

Pentru cuantificarea acestora se utilizează medii nutritive selective. La numărătoarea directă se urmăresc în special microorganismele autotohtone ce iau parte la formarea și transformarea substanțelor humice stabile.

Metodele culturale (indirecte) se pretează mai bine pentru bacteriile zimogene, care după adăugarea de substanțe ușor degradabile, prezintă adesea o înmulțire explozivă.

Întrucât metodele culturale vizează numai, germenii vii capabili de a forma colonii, se vor folosi termeni ca numărarea celulelor vii, numărarea germenilor bacterieni sau unităților formatoare de colonii (colonie forming units). Încă nu s-a stabilit cu exactitate dacă aceste colonii au apărut din celule izolate. Modificările mici (de scurtă durată) ale condițiilor fizico-chimice influențează în primul rând microorganismele zimogene. De aceea la numărarea celulelor vii s-a admis o toleranță mai mare decât la numărarea totală a bacteriilor. Între aceste două categorii există însă o corelație statistic semnificativă (Trolldenier, 1973).

Există multe variante ale metodelor clasice de microbiologia solului, numărători microscopice, numărători culturale (Page și colab., 1982; Dunger și Fiedler, 1989).

16.19.2. Determinarea indirectă a biomasei microbiene

În ultimii ani metodele indirecte de determinare a biomasei au câștigat în importanță. Acestea necesită un timp relativ scurt și prezintă o bună reproductibilitate (repetabilitate). În general, nu este posibilă o diferențiere precisă între partea (componenta) activă și cea inactivă (starea de repaus) a biomasei din soluri. De asemenea, biomasa bacteriană nu poate fi deosebită de cea fungică.

Determinarea biomasei prin fumigație-incubare

(Fumigation-Incubation; fumigation-incubation)

Principiul metodei

Solul se gazează (se fumighează) cu cloroform în scopul omorării microorganismelor. Microorganismele inoculate (probă de sol netratată cu cloroform) vor înlocui pe perioada unei incubatii de 10 zile microorganismele moarte. Aceasta va conduce la o creștere a degajării de CO_2 ("flush of decomposition") care va reprezenta cantitatea biomasei C.

Materiale necesare

- tub de sticlă
- sticlă de 1000 ml cu dop etans
- tuburi de centrifugă sau saci de polietilenă
- hârtie de filtru

- oxid de aluminiu bazic 90 activ
- cloroform fără alcool (70 ml cloroform se filtrează printr-o coloană de sticlă umplută cu 50 g oxid de Al bazic. Primii 25 ml se mai filtrează încă o dată. Cloroformul se poate păstra timp de 14 zile într-o sticlă brună.)
- soluție de clorură de bariu 1M (20,8 g BaCl_2 se dizolvă în apă distilată până la 100 ml).
- HCl 0,1 M
- NaOH 0,1 M
- Indicator: fenolftaleină (0,1 g fenolftaleină se dizolvă în etanol până la 100 ml).

Tehnica de lucru

Se cântăresc câte 150-200 g sol natural (umed) care se introduc în 4 cristalizoare sau în 4 vase de sticlă largi. Într-un exicator care a fost tapizat cu hârtie de filtru se introduc două probe și un pahar de sticlă umplut cu 50 ml cloroform. Apoi aerul din exicator va fi evacuat prin intermediul unei trompe de apă, până ce cloroformul începe să fiarbă. Apoi se închide robinetul de la exicator. După circa 24 de ore de fumigație cu cloroform la temperatura camerei și la întuneric, cloroformul se va îndepărta din exicator prin închidere și deschidere succesive. Acest proces se va repeta de circa 10 ori.

Pentru proba martor determinarea se face în mod identic, dar se renunță la adăugarea cloroformului,

După scoaterea probei fumigate de sol, acesta se va amesteca cu inoculul în proporție de 1%. Se vor cântări 2-30 g sol în 8 tuburi de centrifugă sau săculețe (4 probe martor și 4 probe experimentale) și se atârnă împreună cu sticla care conține NaOH 0,1 M. Sticlele se închid și se supun incubării timp de 10 zile, la 25°C , la întuneric.

Tuburile, respectiv săculeții se vor introduce tot la 3 zile în sticle Schott proaspăt pregătite cu NaOH 0,1 M. Pierderea de apă în cazul solului pe perioada incubării se va aprecia prin cântărire. Paralel vom avea și probe martor, fără sol. Determinarea CO_2 absorbit are loc în mod analog cu determinarea respirației solului în condiții de laborator.

Calculul rezultatelor

Se efectuează pe baza următoarelor formule:

$$C = \frac{(BV \cdot VP) \cdot 0,6 \cdot 100 \cdot 100}{BW\% \cdot TS}$$

$$D = \frac{(BV \cdot LP) \cdot 0,6 \cdot 100 \cdot 100}{EW\% \cdot TS}$$

$$B = \frac{C-D}{0,45}$$

În care:

- C și D – valoarea medie a CO₂ degajat în cazul probei experimentale, respectiv în cazul probei martor (cu sol nefumigat) (mg CO₂-C•100 g⁻¹TS•10 D⁻¹)
- BW – consum mediu de HCl în ml pentru probele martor (fără sol)
- VP – consum mediu de HCl în ml pentru probele experimentale (fumigat)
- LP -consum mediu de HCl în ml pentru proba martor (cu sol, nefumigat)
- 0,6 – 1 ml HCl 0,1 M corespunde la 0,6 mg CO₂-C
- 100 – transformare la 100 g TS (substanță uscată)
- EW – eroare de cântărire în g (pierderea în greutate la împărțirea unei probe mari în probe mici)
- 100%⁻¹TS – factorul substanței uscate
- B – mg biomasă C•100 g⁻¹TS
- 0,45 – factor K_c – proporția de biomasă C care se mineralizează la CO₂ în timpul incubării

Observații

1. Pentru relația $B = \frac{C-D}{0,45}$ se presupun următoarele ipoteze

(Jenkinson și Ladd, 1989):

- C din microorganismele moarte se mineralizează mai repede la CO₂ decât cel din microorganismele vii;
- Majoritatea microorganismelor sunt omorâte de cloroform;
- Partea de biomasă ce este omorâtă în perioada de incubare a unui sol netratat este neglijabilă în comparație cu varianta tratată;
- Valoarea K_c este aceeași pentru diferite soluri. Deci se poate aplica în cazul unor soluri ce se diferențiază atât cantitativ cât și calitativ ca biomasă;
- Cloroformul acționează în sol în direcția omorării microorganismelor, dar nu prezintă o degajare de CO₂ nespecifică, prin metabolii microbieni modificați;

2. Valorile K_c(CO₂-C coeficient/C din microorganisme) nu au fost măsurate până acum *in situ*. Datele disponibile provin din experimente *in vitro* realizate în condiții standard. Valorile K_c determinate de diferiți autori se situează între 0,41-0,58, cu excepția solurilor acide.

Pentru o temperatură de incubare de 25°C cea mai potrivită valoare este de 0,45 (Sparling, 1985).

3. Pentru determinare se va folosi numai sol umed natural, având conținutul optim de apă (50% din capacitatea pentru apă).

16.20. Testul de reducere microbiană a fierului trivalent

Este un test ecotoxicologic prin care se evidențiază efectul substanțelor poluante (solvenți organici, hidrocarburi, pesticide, metale grele etc.), asupra populațiilor microbiene din sol sau din sedimente acvatic. Microorganismele fier-reducătoare sunt heterotrofe și anaerobe sau facultativ anaerobe, ele reducând Fe^{3+} la Fe^{2+} , proces ce poate fi estimat cantitativ prin determinarea intensității fotocolorimetric sau spectrofotometric.

Principiul metodei. La sol sau la sedimentul acvatic se adaugă glucoză și o soluție de clorură ferică (FeCl_3). Sub acțiunea populațiilor microbiene, fierul trivalent se reduce la fier bivalent, care este solubil. Fierul bivalent se evidențiază în mod specific cu reactivul α, α' -dipiridil, dând o colorație roșie, a cărei intensitate reflectă activitatea microorganismelor din acest grup ecologic, constituind un indiciu al activității biologice din sol sau din sedimentul acvatic.

Materiale necesare

- probe de sol, recent colectate,
- probe de sedimente acvatic (nămol terapeutic, sediment de râu)
- soluție de glucoză 4%,
- soluție de FeCl_3 (1,5 g FeCl_3 se dizolvă în 100 ml HCl 0,01 N),
- soluție KCl 2M,
- soluție de α, α' -dipiridil (0,2 g α, α' -dipiridil se dizolvă în 100 ml de acid acetic 10%),
- sticlărie (eprubete, baloane, pâlnii, pipete)
- aparate: termostat, centrifugă, fotocolorimetru.

Tehnica de lucru

În eprubete se introduc câte 3 g sol sau sediment acvatic. Se pipetează apoi soluția de glucoză, soluția de clorură ferică, precum și apă distilată conform schemei din tabelul 24

Tabel 24

Schema amestecurilor de reacție

Nr. probă	Varianta	Tipul de sol sau sediment acvatic	Sol (g)	Sedim. (g)	Soluție glucoză (ml)	Soluție FeCl ₃ (ml)	Apă distilată (ml)	Incubare
1	mar-tor	Sol 1	3	-	5	-	5,5	28°C
2	idem	Sedim.1	-	3	5	-	5,5	24h
3	Expe-ri-ment	Sol 1	3	-	5	0,5	5,0	
4	Idem	Sedim.1	-	3	5	0,5	5,0	

Eprubetele se închid cu dopuri de plută sau cauciuc (dar nu etanș), se agită bine și se pun la incubat 24-72 ore. După incubare, în fiecare eprubetă se introduc 5 ml soluție de KCl 2M. După agitare, conținutul eprubetelor se filtrează prin hârtie de filtru sau se centrifughează (30 minute, la 4000 rotații/minut). Din filtrat se iau 7 ml apoi se adaugă 1 ml soluție de α, α' -dipiridil. În prezența ionilor de Fe^{2+} apare o colorație roșie. Soluția colorată se fotocolorimetrează folosind filtrul albastru (respectiv la 240 nm). Concentrația de Fe^{2+} se stabilește pe baza curbei etalon ce se obține cu soluții de $FeCl_2$ de concentrații cunoscute, cuprinse între 1,5-0,15%.

Mai adăugăm că în cadrul amestecurilor de reacție, pe lângă soluri diferite, sedimente acvatice, nepoluare sau cu grade diferite de poluare, se pot introduce și amestecuri de reacție în plus, în care în loc de 5 ml apă distilată se pot folosi 5 ml de soluții cu substanțe toxice.

Exprimarea reducerii fierului trivalent se poate face și sub formă procentuală.

16.21. Cultivarea microorganismelor parafinooxidante

Poluarea apelor cu țitei și a solurilor cu diferite produse obținute din țitei constituie probleme din ce în ce mai frecvente. Totul depinde de gradul poluării. Dacă poluarea este redusă, se poate aștepta că va avea loc autoepurarea apelor și solurilor sub acțiunea microorganismelor, deoarece multe microorganisme (bacterii, actinomicete, mucegaiuri și drojdii) sunt capabile de a folosi hidrocarburile din țitei drept surse de carbon și energie. Experimental se lucrează cu un produs obținut din țitei și anume parafina solidă.

Principiul metodei. La un mediu mineral lichid se adaugă câteva picături de parafină, apoi mediul se inoculează cu grăuncioare de sol sau cu diluții de sol. În cursul incubării, microorganismele prezente în

grăuncioarele de sol sau în diluțiile de sol vor folosi parafina drept sursă de carbon și energie, se vor multiplica și vor forma colonii pe suprafața picăturilor de parafină. Din colonii se efectuează frotiuri care se colorează prin metoda Ziehl-Neelsen. Micobacteriile parafinooxidante ca și micobacteriile patogene pentru om și animale se colorează în roșu, iar bacteriile, actinomicetele și micromicetele neparafinooxidante se colorează în albastru.

Materiale necesare

- Mediu nutritiv Söhngen
- Parafină solidă
- Fucsină Ziehl
- Albastru de metilen 1% , fenicat
- Sticlărie: baloane de 250 ml, de 100 ml, cu fund plat, pipete gradate sterile, pipete Pasteur sterile, eprubete
- Probe de sol sau de sedimente acvatice, de dată recentă colectate
- Ser fiziologic steril (soluție salină izotonică de NaCl 0,85%)

Tehnica de lucru

Se prepară mediul nutritiv Söhngen cu următoarea compoziție

NH ₄ Cl	0,25 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,1 g
CaCO ₃ siccum	0,1 g
H ₂ O distilată	500 ml

Mediul se repartizează în baloane de 250 ml sau de 100 ml, câte 150 ml/balon, respectiv câte 50 ml/balon. Se sterilizează în autoclav la 112°C, 20 minute, după ce au fost închise cu dopuri de vată. După răcire, pe suprafața mediului se intruduc, cu o pipetă Pasteur sterilă, 10 picături de parafină solidă, în prealabil lichefiată prin încălzire. Parafina se sterilizează într-un balon la 120°C, 30 de minute.

Picăturile de parafină se solidifică rapid pe suprafața mediului lichid răcit.

Dacă se determină numărul cel mai probabil de bacterii parafinooxidante, atunci se vor folosi diluții de sol (3 diluții succesive) și câte 5 baloane de 100 ml cu mediu Söhngen pentru fiecare diluție. Baloanele cu mediu se pot inocula cu grăuncioare de sol. Baloanele însămânțate se pun la incubat. la 30°C. Incubarea durează 10 sau 15 zile. După incubare se urmărește dacă s-au dezvoltat colonii caracteristice pe suprafața picăturilor de parafină.

Dacă s-a aplicat metoda numărului cel mai probabil, se stabilește pentru fiecare din cele 5 baloane, pentru o diluție, câte

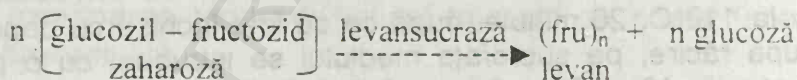
sunt pozitive, adică cu colonii pe parafină. Pe baza tabelului statistic al lui Alexander se stabilește *numărul cel mai probabil de bacterii parafinooxidante*.

Dacă nu s-a apelat la metoda numărului cel mai probabil se notează doar prezența sau absența microorganismelor parafinooxidante într-un anumit sol, în proba de apă sau în sedimentul acvatic studiat. Din coloniile bacteriene apărute pe suprafața picăturilor de parafină se efectuează frotiuri. Acestea se fixează la flacără (tehnica Koch), apoi se degresează cu xilen (1 minut). După evaporarea urmelor de xilen se colorează prin metoda Ziehl-Neelsen. Se vor pune în evidență bastonașele scurte de *Mycobacterium paraffinicum* colorate în roșu (bacterii acidorezistente) în contrast cu bastonașe, spori de micromicete, hife miceliene colorate în albastru (microorganisme neacidorezistente).

Pe baza rezultatelor obținute se pot face referiri la gradul de poluare a solurilor, respectiv a apelor (lacurilor, mărilor, râurilor) cu produse petrolifere și la bogăția microbiotei solului și apelor în bacterii parafinooxidante.

16.22. Cultivarea bacteriilor producătoare de levane

Introducere. Levanele sunt polizaharide ramificate, constituite din resturi de β -fructofuranoză. În catenele liniare ale levanelor, resturile de β -fructofuranoză sunt legate între ele prin legături 2,6, iar ramificarea catenelor liniare se produce prin legături 2,1. În sol, în sedimentele acvatice se găsesc bacterii care acționează asupra zaharozei, sintetizând levane. Formarea levanelor este o reacție de transfer, catalizată de enzima levansucrază:



fru = rest de β -fructofuranoză

În afară de zaharoză, levanele se mai pot forma și din rafinoză, care este un trizaharid conținând un rest de β -fructofuranoză. Produsul de hidroliză a zaharozei (zahărul invertit) nu poate servi ca donator în sinteza levanelor.

Levanele joacă rol însemnat în agregarea particulelor de sol, iar în cazul nămolurilor terapeutice contribuie în măsură ridicată la conferirea proprietății de plasticitate (de aderență a nămolului de epiderma omului).

Principiul metodei. Un mediu nutritiv care conține zaharoză se însămânțează cu sol sau sediment acvatic, se pune la incubat, după care levanele formate se pun în evidență prin cromatografie pe hârtie.

Materiale necesare

- mediu nutritiv specific
- hârtie cromatografică
- trusă de desen
- tanc de dezvoltare
- sticlărie (baloane, eprubete, pipete gradate, pipete Pasteur)
- probe de sol proaspăt colectate, respectiv de sedimente acvatic

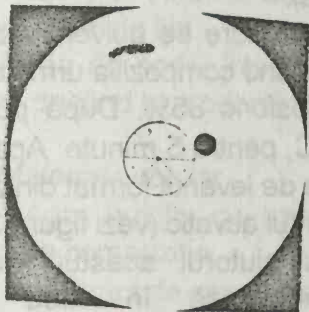


Fig.30. Modelul cromatogramei circulare

Tehnica de lucru

Se prepară următorul mediu nutritiv:

Zaharoză	10 g
KCl	0,25 g
Na_2HPO_4	0,1 g
Peptonă	0,05 g
Apă distilată	50 ml

Mediul se repartizează în baloane sau eprubete, acestea se

închid cu dopuri de vată și se sterilizează la 105°C , 20 de minute.

Baloanele și eprubetele se inoculează cu granule de sol sau cu sediment acvatic (un vârf de spatulă). Probele inoculate se pun la incubat, la $28-30^\circ\text{C}$, pentru 7 zile.

După incubare se examinează recipientele cu mediu. Macroscopic se observă opalescența de tip lăptos, iar la deschidere un miros ușor aromatic.

Prezența în mediu a levanelor se determină prin cromatografie pe hârtie. Se aplică tehnica circulară. Se va lucra cu hârtie cromatografică Whatman 1, Whatman 2, Whatman 3, respectiv Schleicher-Schüll. Se prepară cromatograme circulare cu diametrul de 19 cm. La mijlocul hârtiei se desenează două cercuri concentrice: cel interior având raza de 2 cm, iar cel exterior de 2,7 cm. Se împarte cercul interior în 8 părți egale și se desenează 8 triunghiuri egale, pe care le separăm între ele prin tăiere cu lama (vezi și figura 30). Desenarea se face cu un creion grafit. Pe cercul exterior se desenează 8 puncte la distanțe egale între ele, în așa fel ca fiecare punct să fie pe linia care ar divide baza triunghiurilor. Triunghiurile se notează de la 1-8.

Cromatograma se așează pe o cutie Petri deschisă (fără capac).

În condiții aseptice se recoltează cu pipete Pasteur sterile cantități mici de lichid de cultură (cca 0,5 ml) și se aplică o picătură cu diametrul de circa 10 mm pe cercul exterior unde se află punctul marcat. Se vor

recolta lichide de cultură din toate recipientele. Se vor folosi și soluții de referință: fructoză 2%, levan 0,25%, aplicându-se cu pipeta o picătură pe punctele corespunzătoare triunghiurilor 7 și 8.

Cromatogramele astfel pregătite se pun la dezvoltat (pentru migrarea și separarea substanțelor în funcție de GM (în sistemul de dizolvanți n-propanol, acetat de etil, apă distilată [6:1:3 vol./vol.])). Durata dezvoltării: 2,5 ore la temperatura camerei.

Urmează detectarea cromatogramei, care se pulverizează cu un reactiv pe bază de uree și acid o-fosforic, având compoziția următoare: 1 g uree, 25 ml etanol și 5 ml acid o-fosforic 85%. După pulverizare cromatograma se usucă în etuvă, la 110°C, pentru 5 minute. Apar spoturi de culoare albastră la punctul de start, date de levanul format din zaharoză sub acțiunea bacteriilor din sol sau sedimentul acvatic (vezi figura 31).

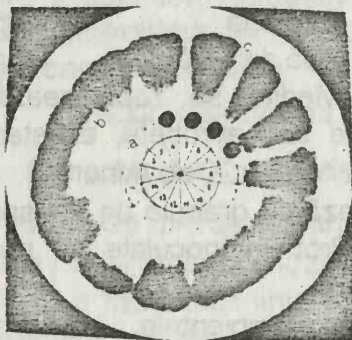


Fig.31. Aspectul cromatogramei detectate
a=levan; b=oligofructozide; c=fructoză

Cu ajutorul acestui reactiv se evidențiază în mod specific cetozele libere și combinate (fructoza, oligofructozidele și polizaharidele levan și inulină=fructane.

Ureea cu fructoza (care pierde o moleculă de apă) dă o colorație albastră de tipul furfuroului la care nu i se cunoaște încă structura).

16.23. Metode utilizate în cercetările de ecologie microbiană

16.23.1. Tehnici pentru îmbogățirea sau/și izolarea microorganismelor

16.23.1.1. Tehnica de îmbogățire a bacteriilor Gram-pozitive prin utilizarea azidei de Na.

Azida de sodiu inhibă creșterea celor mai multe bacterii Gram-negative, ducând la predominanța bacteriilor Gram-pozitive.

Material necesar

- Agar nutritiv cu azidă de Na (0,03 g/100 ml mediu) având următoarea compoziție:

- | | |
|-----------------------------------|---------|
| • Extract de carne (beef extract) | 3 g |
| • Peptonă | 5 g |
| • Apă distilată | 1000 ml |
| • Agar-agar | 12 g |
- pH = 7-7,5. Sterilizare, 30 minute la 121°C.
- Cutii Petri sterile.

Tehnica de lucru

Mediul nutritiv se lichefiază pe baia de apă. Se răcește la circa 60°C, când se adaugă azida de sodiu (0,03 g la 100 ml mediu). Se agită bine pentru dizolvarea acesteia și se toarnă în cutiile Petri sterile (25 ml mediu/cutie). După solidificarea mediului, se fac însămânțări cu probe de sol sau apă. Incubarea are loc la 25-30°C, timp de 3-5 zile. Din coloniile apărute se efectuează preparate care se colorează după metoda Gram.

16.23.1.2. Izolarea bacteriilor din genul *Clostridium*

Material necesar

Mediu nutritiv cu următoarea compoziție:

- | | |
|--------------------------------|--------|
| Peptonă | 1 g |
| Lab-Lemco | 1 g |
| Acetat de Na•3H ₂ O | 0,5 g |
| Extract de drojdie | 0,15 g |
| Amidon solubil | 0,1 g |
| Glucoză | 0,1 g |
| L-Cisteină | 0,05 g |
| Agar-agar | 1,5 g |
| Apă distilată | 100 ml |
- pH = 7,1-7,2

- Sulfit de Na 4%
- Citrat feric 7%
- Cutii Petri sterile
- Pipete gradate de 1 sau 2 ml sterile
- Coloană anaerobă etanșă

Tehnica de lucru

Se sterilizează prin filtrare soluțiile de sulfat de sodiu și de citrat feric (se păstrează închise etanș în frigider). Se lichefiază mediul nutritiv, după care la 50 ml mediu se adaugă 0,5 ml sulfat de Na și 0,5 ml citrat feric. Se inoculează cu proba de apă sau sol mediul lichefiat și răcit la 45-48°C, după care se toarnă într-un tub ce se închide etanș. Incubarea se realizează la temperatura de 20-37°C pentru câteva zile. Coloniile bacteriilor anaerobe apar sub formă de pete negre de sulfat feric. Bacteriile obligat anaerobe sunt Gram-pozitive, formatoare de spori, și aparțin genului *Clostridium*.

16.23.1.3. Tehnici de îmbogățire și izolare a bacteriilor celololitice aerobe

Material necesar

- Celuloză pudră
- Mediu cu agar și celuloză având următoarea compoziție:
- Celuloză pudră (trată timp de 12 ore cu HCl 1N, la rece, apoi spălată bine cu apă distilată pentru îndepărtarea acidului) 0,5 g

NaNO₃ 0,1 g

Na₂HPO₄•7H₂O 0,118 g

KH₂PO₄ 0,09 g

MgSO₄•7H₂O 0,05 g

KCl 0,05 g

Extract de drojdie 0,05 g

Cazeină hidrolizată 0,05 g

Agar-agar 1 g

Apă dist. ad 1000 ml

pH = 6,8

Tehnica de lucru

Pentru îmbogățirea în bacterii aerobe celololitice se amestecă 100 g sol proaspăt cu 5 g celuloză pudră într-o cutie Petri și se ține 8 zile la 28°C, menținându-se o umiditate potrivită. Pentru izolarea bacteriilor celololitice aerobe, mediul descris mai sus (mediu cu agar și celuloză) se lichefiază pe baia de apă, urmărindu-se ca toată celuloza să fie bine distribuită în mediu, apoi se toarnă în cutii Petri sterile, iar după solidificare se însămânțează cu material de îmbogățire din cutia Petri. Se lasă la incubat 8 zile, la 28°C. După incubare se urmărește apariția coloniilor cu un inel foarte mic de digestie a celulozei în jurul lor. Bacteriile celololitice

pot fi purificate prin creșterea lor pe un mediu lichid conținând kanamicină (0,5-1 mg %).

16.23.1.4. Tehnici de îmbogățire și izolare a microorganismelor chitinolitice

Material necesar

Chitină (din exoscheletele de raci de râu, raci de mare, creveți, crabi).

Mediul mineral cu următoarea compoziție:

K_2HPO_4	0,1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
NaCl	0,05 g
$CaCl_2$	0,01 g
Fe ca și $Fe_2(SO_4)_3$	0,5 mg
NH_4Cl	0,1 g
Apă dist.ad	100 ml
pH=7	

Mediul se solidifică prin adăugarea de agar-agar în proporție de 1,5%.

Sterilizarea se efectuează la 121°C, 30 de minute.

HCl	1%
KOH	2%
Etanol	95%
H_2SO_4	50%
Pâlnie Büchner	

Tehnica de lucru

Obținerea preparatului de chitină

Se spală în apă caldă exoscheletele de crustacee. Apoi se decalcează în HCl 1% (vol./vol.). Se schimbă HCl zilnic, timp de 4 zile. Chitina se spală apoi cu apă pentru a îndepărta HCl. Se lasă apoi chitina în KOH 2% timp de 10 zile. Se aduce chitina și KOH la fierbere după care se lasă la rece. Se repetă acest tratament (încălzire și apoi răcire) de 4 ori într-un interval de 10 zile. Se spală apoi chitina pentru a îndepărta KOH. Se taie în bucăți și se șterge de 4 ori prin fierbere cu alcool. Bucățile de chitină apoi se usucă.

În baloane de 250 ml se pregătește o cultură de îmbogățire constând din 50 ml mediu mineral și câteva (5-10) bucăți de chitină purificată. Baloanele se însămânțează cu nămol marin sau cu sol și se pun la incubat pentru 1-3 săptămâni, la întuneric, la 25-30°C. După 2-3 săptămâni, alte baloane cu mediu proaspăt conținând chitină purificată sunt inoculate din baloanele inițiale pentru a îmbogăți microorganismele chitinolitice. Acest procedeu se repetă de câteva ori.

În continuare plăcile Petri conținând mediu nutritiv cu chitină solidificat cu agar-agar se însămânțează cu 1-2 picături din culturile de îmbogățire (bucățile de chitină se dizolvă - tratează - cu H_2SO_4 50%

(vol./vol.)), după care se precipită chitina cu apă, spălându-se în continuare cu apă pentru îndepărtarea acidului sulfuric, utilizând o pâlnie Büchner). Mediul se sterilizează la 121°C, 30 minute. Incubarea are loc la 28-30°C, timp de câteva zile (7-21 zile).

În baloanele cu culturile de îmbogățire se observă pe bucățile de chitină un halou de descompunere. Din aceste zone se poate recolta cu ansa efectuându-se însămânțări în cutiile Petri. Microorganismele chitinolitice produc colonii care clarifică mediul în jurul lor.

16.23.1.5. Tehnici de îmbogățire pentru ferobacterii

Material necesar

- Resturi de plante (lucernă)
- FeSO_4
- NaOH
- MnCO_3
- Cilindri gradați de 100 ml

Tehnica de lucru

1. Se cântăresc 10 g de frunze+tulpini de lucernă, care se fierb timp de 30 minute într-un litru de apă. Se îndepărtează lichidul și se păstrează materialul cu extract de plante. (Acesta poate fi uscat și apoi păstrat).

2. Se prepară hidroxidul feric ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), proaspăt înainte de întrebuințare prin adăugarea de NaOH (soluție concentrată) la o soluție de FeSO_4 (picătură cu picătură) până se formează hidroxid feric. Se spală precipitatul pe hârtie de filtru într-o pâlnie Buchner cu apă distilată pentru a îndepărta NaOH (până când apa de spălare nu mai este alcalină).

3. Se adaugă circa 5 g extract de plante la 0,5 g MnCO_3 și circa 1 g $\text{Fe}(\text{OH})_3$ greutate umedă într-un cilindru gradat de 100 ml. Se adaugă apă de lac, baltă, râu, sol. până la semn. Se acoperă cu o folie de plastic pentru a preveni evaporarea. Incubarea se realizează la întuneric timp de 1-2 săptămâni, la 25°C.

Se examinează stratul (depunerile, solzii, coaja) de culoare roșiatică-brunie de pe pereții cilindrului aproape de suprafață. Se examinează într-o picătură de apă o cantitate mică din această depunere, urmărindu-se prezența în special a filamentelor de *Sphaerotilus* încrustate cu un strat brun-auriu de oxizi de fier sau de mangan.

16.23.1.6. Tehnici de îmbogățire și izolare a bacteriilor care oxidează sulf

Material necesar

- Baloane de 250 ml închise cu dopuri de vată sau dopuri de plută

Mediu de îmbogățire

K_2HPO_4	0,1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
NH_4NO_3	0,1 g
Floare de sulf	1 g
$CaCO_3$	1 g
Apă distilată ad	100 ml

Mediu de izolare

a). Mediu bazal

K_2HPO_4	0,05 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,05 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
$CaCl_2$	0,01 g
Na_2CO_3	0,01 g
Silicat de Na	0,1 ml
Soluție de microelemente	1 ml
Apă distilată ad	100

b). Soluție de polisulfură.

Se aduce în stare de saturație o soluție de Na_2S în apă cu sulf elementar.

Tehnica de lucru.

1. Baloane cu 50-100 ml mediu de îmbogățire se inoculează cu 1 g sol sau 5 ml apă. Baloanele se închid cu dopuri de vată. Se lasă la incubat, la întuneric, 1-2 săptămâni la 25°C. Îmbogățirea poate fi repetată prin inocularea unui balon cu mediu proaspăt cu câteva picături din cultura de îmbogățire.

2. Pentru izolare se prepară mediul bazal, care se sterilizează la 110°C, timp de 30 minute. La 25-30 ml mediu bazal agarizat lichefiat și răcit la 45-50°C se adaugă 1-1,5 ml HCl 0,1 N. Se amestecă bine. După solidificare se însămânțează cu 1-5 picături din mediul de îmbogățire. Incubarea are loc 5-7 zile la 25°C, la întuneric. Din mediul bazal lichid steril cu polisulfură se iau 10 ml și se adaugă peste mediu agarizat solidificat. Se lasă să se absoarbă. HCl va difuza în stratul superior și va duce la precipitarea sulfului sub formă de suspensie fină.

După incubare se urmărește apariția coloniilor în jurul cărora mediul se clarifică, bacteriile fiind capabile de oxidarea sulfului.

16.23.1.7. Procedeu de îmbogățire și izolare pentru Thiobacillus

Material necesar

Mediu S

Sulf (sau $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	1 g (sau 0,5 g)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2-0,4 g
KH_2PO_4	0,2-0,4 g
CaCl_2	0,025 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
Soluție de microelemente	1 ml

Compoziția soluției de microelemente este următoarea.

EDTA acid 5 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,2 g, CaCl_2 0,544 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,506 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,499 g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,11 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,157 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,161 g, H_2O dist.ad 100 ml, pH 6 (se ajustează cu KOH).

Mediul cu sulf se sterilizează la 105°C, 30 minute, în trei zile consecutive.

Soluția de microelemente se sterilizează separat la 105°C, 20 minute, în trei zile consecutive.

Mediul R

NH_4Cl	0,05 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
KH_2PO_4	0,2 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
KNO_3	0,2 g
NaHCO_3	0,1 g
Soluție microelemente	1 ml
Apă dist.ad	100 ml

Sterilizarea se realizează la 105°C, 30 minute, în trei zile consecutive.

Mediul F

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,015 g
KCl	0,005 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
KH_2PO_4	0,005 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,001 g
FeSO_4 (10%)	1 ml
Soluție de microelemente	1 ml
Apă dist.ad	100 ml

Sterilizarea se realizează la 105°C, 30 minute, în trei zile consecutive.

Tehnica de lucru

Mediile se repartizează în baloane de 250 ml (50 ml/balon), în așa fel încât să se obțină un strat subțire de lichid. Se sterilizează la temperaturile indicate. Apoi se inoculează cu probe de sol sau de apă. Incubarea are loc la 25-30°C, timp de 3-7 zile. Creșterea este indicată de turbiditatea culturii și de micșorarea pH-ului. Mediul S selectează grupul *Thiobacillus thiooxidans*, având inițial pH 5, în timp ce *Th. thioparus* este selectat la pH 7,5. Mediul R selectează tiobacilii denitrificatori, iar *Th. ferrooxidans* modifică pH la 3,5, creșterea fiind indicată și de brunificarea mediului, pe lângă scăderea pH-ului.

16.23.1.8. Procedeu selectiv - pentru izolarea și creșterea bacteriilor sulfat-reducătoare

Mediul necesar

Mediul B

KH_2PO_4	0,05 g
NH_4Cl	0,1 g
CaSO_4	0,1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Lactat de Na	0,35 g
Extract de drojdie	0,1 g
Acid ascorbic	0,1 g
Acid tioglicilic	0,1 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Apă dist. ad	100 ml

pH= 7,0-7,5

Mediul se sterilizează la 120°C, 30 de minute.

*Pentru izolarea din probele de apă de mare în locul apei distilate se utilizează apă de mare sau apă distilată la care se adaugă NaCl în proporție de 2,5%.

Tehnica de lucru

Baloanele de 100 ml conținând mediul nutritiv (90 ml/balon) se sterilizează la 120°C, 30 de minute. Se însămânțează cu circa 10 ml probă de sol, de apă de lac, de mare etc. Incubarea are loc la 30°C, timp de 3-7 zile. Innegrirea mediului după incubare indică prezența bacteriilor sulfat-reducătoare. Pentru depistarea speciilor de *Desulfovibrio* se recoltează 1 ml de cultură (din lichidul supernatant, evitându-se precipitatul de FeS), care se centrifughează la 3500 rotații/minut, timp de 30 de minute. Lichidul supernatant se înlătură. La sedimentul recoltat pe o sticlă de ceas se adaugă 1 picătură de NaOH 2N și se examinează apoi la o lampă cu UV la lungime de undă mare (3750 Å).

16.23.1.9. Izolarea bacteriilor sulfat-reducătoare

Material necesar

- Agar suplimentat cu Na_2SO_4 0,5 g/100 ml și FeSO_4 0,005 g la 100 ml.
- Cutii Petri sterile
- Probe de sol și de apă

Tehnica de lucru

Mediul nutritiv suplimentat cu Na_2SO_4 și FeSO_4 se lichefiază și se toarnă în cutii Petri, într-un strat gros (0,5-1 cm) după ce a fost răcit la 45-48°C, peste inoculul introdus sub formă de suspensie de sol sau apă de lac. Incubarea are loc la 25-30°C, în condiții anaerobe, timp de 1-2 săptămâni. Coloniile care se dezvoltă vor fi înconjurate de o zonă neagră rezultată din precipitarea FeS .

16.23.1.10. Îmbogățirea și izolarea bacteriilor din genul *Beggiatoa*

Material necesar

Mediul nutritiv:

Extract de carne (Beef extract)	0,2 g
Agar-agar	1 g
Apă dist.	100 ml
Fân (sau resturi de plante)	

Tehnica de lucru

1. Fânul uscat este fiert de 3 ori (30 minute) într-un volum mare de apă (10 g fân în 150 ml apă).

2. Extractul de fân este drenat și apoi uscat la 37°C.

3. Se prepară un mediu de îmbogățire alcătuit din extract de fân uscat (0,8 g extract de fân/100 ml apă dist.) și apă și se repartizează în baloane de 125 ml (70 ml mediu/balon). Se sterilizează la 110°C, 30 de minute, după care se inoculează cu nămol din apă dulce sau din ape sărate. Incubarea are loc la întuneric, la 28°C, timp de 10 zile. Creșterea bacteriilor din g. *Beggiatoa* apare sub forma unui film alb pe suprafața mediului sau submers pe pereții balonului, degajându-se și un miros puternic de H_2S . De pe acest mediu de îmbogățire unde se întâlnesc și un număr mare de ciliate, *Beggiatoa* poate fi izolată prin însămânțarea din acest film alb pe mediu nutritiv cu extract de carne și agar-agar. Se repetă inoculările până când cultura rămâne pură.

16.23.1.11. Procedeu de îmbogățire pentru bacterii din familia Pseudomonadaceae

Pseudomonadele (bacteriile din fam. *Pseudomonadaceae*) sunt bacterii Gram-negative care se găsesc în sol, apă, aer. Ele pot utiliza o largă varietate de substanțe organice, între care și compuși aromatici heterociclici ca sursă de carbon. În condiții anaerobe unele specii sunt capabile de reducerea disimilatorie a nitraților la nitriți și/sau N_2 . Mai multe specii sunt capabile să sintetizeze pigmenți solubili în apă. O metodă simplă de detectare a speciilor de *Pseudomonas* în soluri se bazează pe cultivarea bacteriilor pe mediu cu agar și identificarea pigmentilor celulari.

Material necesar

- Baloane Erlenmeyer
- Cutii Petri sterile
- Pipete gradate de 1-2 ml sterile
- Lampă UV

Medii de creștere și îmbogățire (după K. Alef, 1995)

Pseudomonas - agar F

Peptonă din cazeină	10 g
Peptonă din carne	10 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g
K_2HPO_4	1,5 g
Agar	12 g
Glicerină	10 ml

Se dizolvă ingredientele în 800 ml apă distilată. Se ajustează pH la 7,2 și se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se sterilizează la $120^\circ C$, 30 de minute.

Pseudomonas - agar P

Peptonă din gelatină	20 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,4 g
K_2HPO_4	1,5 g
Agar	12 g
Glicerină	10 ml

Se dizolvă ingredientele în 800 ml apă distilată. Se ajustează pH la 7,2. Se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se sterilizează la $120^\circ C$, 30 de minute.

Kings - agar B

Peptonă	20 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g
$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	1,8 g
Agar	12 g

Glicerină

10 ml

Se dizolvă ingredientele în 800 ml apă distilată. Se ajustează pH la 7,2. Se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se sterilizează la 120°C, 30 de minute.

Tehnica de lucru

În baloane Erlenmeyer de 200 ml se pun 99 ml apă distilată și se autoclavează la 120°C, 20 de minute. După răcire se adaugă 1 g de so proaspăt recoltat. Se ține la 30°C, 30 de minute, agitându-se continuu. Se lasă în repaus o oră. Apoi din supernatant se prepară diluții în NaCl 0,9% (10^{-3} - 10^{-7}). Din fiecare diluție se ia 0,1 ml și se dispersează pe suprafața unei cutii Petri cu mediul cu agar solidificat. Se incubează la 30-37°C, câteva zile. Coloniile de *Pseudomonas fluorescens* (pe Kings-agar B) pot fi identificate pe baza unei fluorescențe galbene spre galben-verde. Coloniile de *Pseudomonas aeruginosa* (pe Pseudomonas - agar F) pot fi identificate prin detectarea fluorescenței la 366 nm. Este de notat că pe mediile descrise pot crește și alte multe bacterii, în afară de pseudomonade.

16.23.1.12. Îmbogățirea în bacterii oligotrofe

Bacteriile oligotrofe includ diferite grupe de bacterii din punct de vedere taxonomic și fiziologic. Aceste bacterii sunt capabile să crească la o concentrație scăzută de nutrienți. În aceste condiții, creșterea altor grupe de microorganisme nu este posibilă (după Ohata și Hattori, 1983; Suwa și Hattori, 1984; Williams, 1985; Whang și Hattori, 1988; Sugimoto și colab., 1990; cit. Alef și Nannipieri, 1995).

Medii de creștere

Peptonă	10 g
Extract de carne	10 g
NaCl	5 g

Se dizolvă ingredientele în 800 ml apă distilată. Se ajustează pH la 7 - 7,2. Se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se sterilizează la 120°C, 30 de minute. Acest mediu stoc se diluează în momentul folosirii cu apă de canal sterilizată de 100, 1000 și 10.000 ori. Pentru prepararea mediilor solide se adaugă agar la mediu (1,5%).

Mediu KB (după Sugimoto și colab., 1990)

Apă distilată	990 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1,5 g
Peptonă	20 g
Glicerină	10 ml

Se ajustează pH la 7,2 cu NaOH 0,1 M. Pentru îmbogățirea și izolarea bacteriilor oligotrofe acest mediu trebuie diluat cu apă distilată de cel puțin 250 ori. Se sterilizează la 120°C, 30 de minute.

Adăugarea următorilor inhibitori de creștere la mediul KB diluat face posibilă îmbogățirea în pseudomonade oligotrofe:

A. Novobiocină 45 mg/l mediu

Penicilină G 75.000 u.i./l mediu

Cicloheximidă 75 mg/l mediu

Se dizolvă aceste antibiotice în 3 ml etanol (95%), apoi se diluează cu 50 ml apă distilată sterilă, adăugându-se apoi la 940 ml mediu autoclavat și răcit la 45°C (mediu KB diluat).

B. Irgasan 25 mg/l mediu

Se dizolvă 25 mg Irgasan în 2 ml etanol (95%), se diluează cu 50 ml apă distilată sterilă și se adaugă la 950 ml mediu autoclavat și răcit la 45°C.

C. Cristal violet - nitrofurantoin (Kruger și Sheick, 1987)

Cristal violet 1-2 mg/l mediu

Nitrofurantoin 350 mg/l mediu

Se prepară o soluție de cristal violet 0,1% în apă distilată și nitrofurantoin 5% în N,N-dimetilforamidă, se menține la temperatura camerei, la întuneric. La 990 ml mediu KB-diluat de 250 de ori, autoclavat și răcit la 45°C, se adaugă 2 ml soluție cristal violet sterilizată prin filtrare, amestecându-se bine. Se adaugă, în final, la mediu 7 ml soluție de furantoin sterilizată prin filtrare. Se inoculează cu sol (0,1 g la 50 ml mediu). Se incubează la 22°C, cel puțin 14 zile.

16.23.1.13. Procedeu de îmbogățire în bacterii nitrificatoare (după Alef, 1995)

Mediu de creștere pentru nitritbacterii

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl	2 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,2 g
FeSO ₄ •7H ₂ O	0,05 g
CaCO ₃	6 g
Soluție de microelemente	10 ml

Se dizolvă în 800 ml apă distilată. Se ajustează pH la 7,6, apoi se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se sterilizează la 120°C, 20 de minute.

Soluție de microelemente (în mg)

Fe III - citrat	1000
MnCl ₂ •4H ₂ O	10
ZnCl ₂	5
LiCl	5
KBr	2,5K
KJ	2,5

CuSO ₄	5
CaCl ₂	1000
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	1
CoCl ₂	5
SnCl ₂ •H ₂ O	5
BaCl ₂	5
AlCl ₃	1
H ₃ BO ₃	10
EDTA	20
H ₂ O distilată	1000 ml

Se sterilizează la 112°C, 20 de minute. Se adaugă 2-10 ml la un litru mediu de cultură.

Mediu de creștere pentru nitratbacterii

NaNO ₂	0,1 g
CaCO ₃	6 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,2 g
FeSO ₄ •7H ₂ O	0,005 g
NaCl	0,5 g

Se dizolvă în 800 ml apă distilată. Se ajustează pH la 7,6, apoi se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se sterilizează la 120°C, 20 de minute.

Tehnica de lucru

Se introduc 50 ml de mediu pentru nitritbacterii, respectiv de mediu pentru nitratbacterii în baloane Erlenmeyer de 300 ml. Se autoclavează la 120°C, 20 de minute. După răcire, în baloane se adaugă 0,1-0,3 g sol proaspăt recoltat. Se incubează la 30°C, la întuneric, în condiții de agitare continuă, timp de 3 săptămâni. Nitriții și nitrații formați pot fi evidențiați cu reactivi specifici, respectiv cu hârtie specială Merck.

16.23.1.14. Procedeu de îmbogățire în bacterii denitrificatoare

Multe grupe de bacterii sunt capabile să utilizeze nitrații ca singură sursă de N (reducerea asimilatorie a nitraților). Bacteriile denitrificatoare sunt aerobe care sunt capabile să utilizeze nitrații ca acceptor terminal de electroni în condiții anaerobe. N₂ este produsul final al reacției (denitrificării).

Pentru îmbogățirea bacteriilor denitrificatoare pot fi utilizate mediile următoare:

Mediu mineral

Acetat de Na	10 g
KNO ₃	20 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,2 g

Se dizolvă în 800 ml apă distilată. Se ajustează pH la 7, apoi se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se sterilizează la 115°C, 20 de minute.

Mediu complex

Extract de carne	1 g
Peptonă	5 g
Extract de drojdie	2 g
NaCl	15 g
KNO ₃	10 g

Se dizolvă în 800 ml apă distilată. Se ajustează pH la 7,4 apoi se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se sterilizează la 120°C, 30 de minute.

Mediu cu bulion

Bulion de carne	40 g
KNO ₃	10 g

Se dizolvă ingredientele în 800 ml apă distilată. Se ajustează pH la 7,4. Se completează apoi cu apă distilată la 1000 ml. Se sterilizează la 120°C, 30 de minute.

Tehnica de lucru

Se repartizează câte 15 ml mediu în eprubete. Se introduce în fiecare eprubetă câte un tubușor Durham. Se autoclavează la 120°C, 30 de minute. După răcire se adaugă în fiecare eprubetă 0,1-0,3 g sol proaspăt. Se incubează la 30°C, 3 săptămâni. Gazul format în tubul Durham poate fi detectat. Nitriții și nitrații pot fi estimați calitativ cu hârtie Merck sau cu reactivi specifici.

16.23.1.15. Izolarea și determinarea numărului cianobacteriilor (după S. Oran, cit. Alef și Nannipieri, 1995)

Cianobacteriile sunt microorganisme procariote ce conțin clorofilă a și eliberează O₂ în procesul de fotosinteză. Ele habitează solul și apele (dulci și marine). Cianobacteriile prezintă diferite forme de organizare: unicelulară, colonială și filamentosă (Bold și colab., 1987, cit Alef și Nannipieri, 1995). Dimensiunile celulelor oscilează între 1-6 μm. În general, cianobacteriile sunt mai mari decât bacteriile tipice, dar sunt mici comparativ cu cele mai multe alge. Ele sunt capabile de fixarea azotului, fiind importante pentru fertilitatea solului. Ele sunt utilizate pentru reactivarea solului, constituind parțial fertilizanți, în special pentru orezării. S-a raportat că cianobacteriile ca *Nostoc*, *Scytonema* și *Anabaena* pot fi utilizate pentru ameliorarea terenurilor alcaline (Hamdi 1988; Shied 1982; Stern 1988; Yanni 1991; Edward și colab., 1992; Fernandes și colab., 1993; Russel și Tranvik, 1993; cit. Alef și Nannipieri, 1995).

16.23.1.15.1. Izolarea și cultivarea cianobacteriilor

Multe medii de cultură sunt cunoscute ca fiind efective pentru izolarea și creșterea cianobacteriilor unicelulare, filamentoase și multicelulare. Se recomandă mediile solide, ele fiind mai de succes, cu toate că multe specii pot fi ușor menținute în medii lichide. Culturile de cianobacterii pot fi conservate prin metode care mențin culturi viabile la temperatura camerei.

Medii de cultură

Mediul A (Allen 1968, modificat după Hughes 1958)

NaNO ₃	1,5 g
K ₂ HPO ₄	0,039 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,075 g
Na ₂ CO ₃	0,020 g
CaCl ₂	0,027 g
Na ₂ SiO ₂ •9H ₂ O	0,058 g
EDTA	0,001 g
Acid citric	0,006 g
Citrat feros	0,006 g
Apă distilată	1000 g
Soluție de microelemente	1 ml
Se ajustează pH la 7,8.	

Soluția de microelemente (g l⁻¹)

H ₃ PO ₄	2,86 g
MnCl ₂ •H ₂ O	1,81 g
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,222 g
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,391 g
CuSO ₄ •3H ₂ O	0,079 g
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	0,049 g
Apă distilată	1000 ml

Mediul solid se obține prin adăugarea de agar în proporție de 1,5%.

Se autoclavează la 120°C, 30 de minute.

Mediul B (Castenholz, 1970)

Acid nitrilotriacetic	0,1 g
CaSO ₄ •2H ₂ O	0,060 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,1 g
NaCl	0,008 g
KNO ₃	0,103 g
NaNO ₃	0,689 g
NaH ₂ PO ₄	0,111 g
FeCl ₃ (soluție 0,2905 g l ⁻¹)	1 ml
Soluție de microelemente	0,5 ml
Apă distilată	1000 ml.

Soluție de microelemente

MnSO ₄ •H ₂ O	2,28 g
ZnSO ₄ •6H ₂ O	0,5 g
H ₃ BO ₃	0,5 g
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,025 g
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,025 g
CoCl ₂ •6H ₂ O	0,045 g
H ₂ SO ₄ conc.	0,5 ml
Apă bidist.	1000 ml.

pH mediului se ajustează la 8,2 cu NaOH (1 M) care dă în final valoarea 7,5-7,6 în urma autoclavării și răcirii mediului.

Acest mediu se pretează pentru menținerea a cel puțin 100 tulpini ale celor cca 25 specii de cianobacterii termofile, la temperaturi cuprinse între 45-70°C (după Carr și colab., 1973; cit. Alef și Nannipieri, 1995).

Tehnica de lucru

Mediul autoclavat la 121°C, răcit la 45-48°C, se toarnă în cutii Petri, câte 20-25 ml/cutie, în condiții aseptice.

Din solul proaspăt colectat se prepară diluții zecimale cuprinse între 10⁻¹ și 10⁻⁷, fiind însămânțate ultimele 3 diluții (1 ml/cutie).

Mediile însămânțate se incubează la 22°C, timp de 4 săptămâni în lumină naturală difuză sau la lumina dată de tuburi fluorescente.

Pentru determinarea numărului de cianobacterii se aplică metoda numărului celui mai probabil (câte 5 eprubete cu 5-10 ml mediu lichid vor fi însămânțate cu 1 ml din diluțiile 10⁻⁵, 10⁻⁶ și 10⁻⁷).

17. ANALIZA BACTERIOLOGICĂ A APEI

Analiza bacteriologică a apei are drept scop aprecierea caracterului de potabilitate, de stabilire a nivelului de poluare bacteriologică și de constituire a potențialului de risc pentru sănătatea colectivității umane. Rezultatele acestei analize se corelează cu acelea ale determinărilor organoleptice, fizico-chimice și biologice, în vederea aprecierii complexe a potabilității apei.

Analiza bacteriologică constă în efectuarea unor metode de analiză grupate în două categorii:

1. *Metode de analiză curentă*, care sunt obligatorii și se aplică la supravegherea calității apei distribuite populației; prin acestea se determină:

- a. numărul total de bacterii mezofile aerobe, la 37°C;
- b. numărul probabil de bacterii coliforme (coliformi totali);
- c. numărul probabil de bacterii coliforme termotolerante (coliformi fecali);
- d. numărul probabil de streptococi fecali;

2. *Metode de analiză complementară*, care se folosesc în situații speciale pentru stabilirea complexă a nivelului de poluare bacteriologică când se alege o sursă de aprovizionare cu apă de suprafață, când apar poluări accidentale, pentru controlul treptelor tehnologice de purificare a apei în stațiile de tratare, în controlul unor deficiențe în rețeaua de distribuție a apei potabile și în cazul unor epidemii hidrice etc. prin care se determină:

- a. numărul total de bacterii care se dezvoltă la 22°C (mezofile);
- b. numărul probabil de clostridii sulfid reducătoare și de bacterii: *Clostridium perfringens*;
- c. numărul probabil de bacterii *Pseudomonas aeruginosa*;
- d. numărul probabil de bacteriofagi enterici: anti-*Salmonella typhi* AVI, anti-*Escherichia coli* Bruxelles și anti-*Vibrio cholerae* grup 0:1;
- e. prezența bacteriilor din genul *Salmonella*;
- f. prezența speciei *Vibrio cholerae* grup 0:1.

DEFINIȚII

1. *Bacteriile mezofile* sunt microorganisme care se dezvoltă la 22°C și la 37°C, capabile să formeze colonii vizibile pe medii nutritive, în anumite condiții de cultură (UFC=Unități Formatoare de Colonii).
2. *Bacteriile coliforme* (coliformi totali) sunt bacili mobili, Gram-negativi, nesporulați care fermentează lactoza la $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$. Se decelează prin producerea de acid și gaz în bulionul-lactoză și se identifică prin aspectul caracteristic al coloniilor formate pe medii selective.
3. *Bacteriile coliforme termotolerante* (coliformi fecali) prezintă caracteristica metabolică de fermentare a lactozei în medii lichide lactozate cu producere de acid și gaz la $44\pm0,5^{\circ}\text{C}$.
4. *Streptococii fecali* sunt coci sferici sau ovalari, Gram-pozitivi, imobili, așezați izolați, în perechi sau lanțuri scurte care se dezvoltă la temperatura de $44\pm0,5^{\circ}\text{C}$, în prezența a 40% săruri biliare și a azidei de sodiu.
5. *Clostridiile* sunt bacili sporulați, anaerobi, Gram-pozitivi, reducători ai sulfidului în sulfură și care în prezența fierului bivalent produc sulfură feroasă de culoare neagră. Specia *Clostridium perfringens* se dezvoltă la temperatura de 45...46°C, produce cheag alveolar în lapte și elaborează lecitinază pe medii cu gălbenuș de ou.
6. *Pseudomonas aeruginosa* cuprinde bacili mobili, nesporulați, Gram-negativi care elaborează doi pigmenți caracteritici: piocianina și fluoresceina. Specia poate fi diferențiată de alte pseudomonade fluorescente prin producerea de piocianină, creșterea la 42°C, hidroliza cazeinei și metabolizarea de trifenil tetrazol clorură (=TTC).
7. *Bacteriofagii enterici* sunt virusuri care lizează enterobacteriile lizosensibile. Prezența bacteriofagilor enterici în apă reprezintă un indicator al prezenței enterobacteriilor omoloage și a posibilei prezențe a enterovirusurilor.
8. *Salmonellele* sunt enterobacterii Gram-negative, mobile, nesporulate, patogene pentru om și animale. Se caracterizează metabolic prin fermentarea glucozei cu producere de gaze, nefermentarea lactozei, producerea de hidrogen sulfurat și folosirea citratului ca sursă unică de carbon. Nu produc inodol, nici urează și prezintă o structură antigenică specifică care permite identificarea lor prin reacții serologice.
9. Genul *Vibrio* cuprinde numeroase specii patogene pentru om și animale dintre care cea mai importantă este *Vibrio cholerae* grup

0:1 cu două biotipuri: *Vibrio cholerae* și *Vibrio El Tor*. Morfotinctorial se prezintă ca bacili scurți, ușor incurbați, mobili, mono- sau multitrichi, Gram-negativi, care se dezvoltă aerob și anaerob facultativ la pH alcalin. Se caracterizează metabolic prin fermentarea glucozei fără gaz, absența fermentării lactozei, absența producerii de hidrogen sulfurat și reacția pozitivă a oxidazei. Se identifică prezumtiv prin aglutinare pe lamă cu ser antiholeric grup 0:1.

Recoltarea probelor

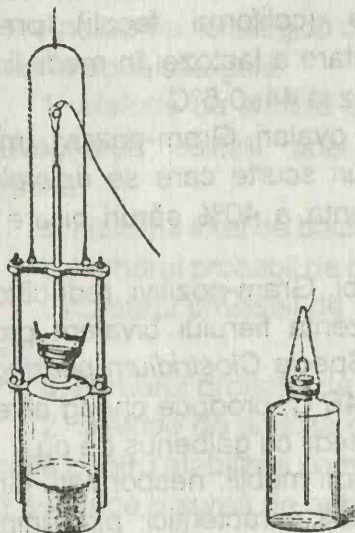


Fig.32. Dispozitive pentru recoltarea probelor de apă

Pentru recoltarea probelor de apă se folosesc flacoane de sticlă cu dop șlefuit de 250, 500 și 1000 ml sterilizate (în etuvă, la 180°C, 60 de minute). De asemenea, se mai pot folosi găleți, de diferite dimensiuni, respectiv pernițe de tifon sterile. Acestea din urmă se confecționează din tifon cu lățimea de 1 m, împăturit sub formă de pătrat cu latura de 20 cm și cusut pe margini, numai pe 3 din cele 4 margini permițând introducerea sitei suport ca într-un buzunar. În plus, se folosesc pâlnii metalice sterile, din tablă zincată, necesare la filtrat apă, precum și pungi de plastic neutilizate, sterile și tiosulfat de sodiu, soluție 0,5% (fig.32).

Modul de recoltare a probelor diferă în funcție de sursa de apă:

1. din instalații centrale (rezervor și rețea de distribuție) și
2. din surse locale (fântâni, izvoare).

Din apele de suprafață sau de profunzime tratate sau dezinfectate, probele se recoltează de la robinete montate în puncte reprezentative fiecărei trepte de tratare.

Pentru recoltare, inclusiv a probelor din rețeaua de distribuție, se deschide robinetul și se lasă să curgă apă timp de 5-10 minute. Se închide robinetul și se flambează. Se deschide din nou robinetul și se reglează debitul apei în așa fel încât să se formeze o coloană continuă de maximum 1 cm diametru. Se scoate dopul flaconului împreună cu capacul de hârtie. Flaconul ținut cu mâna de partea lui inferioară, se așează vertical sub coloana de apă și se umple până la aproximativ 2 cm sub dop. Se închide cu dopul flaconului, se pune și capacul de

hârtie care se leagă din nou cu sfoară, apoi se notează. Din bazin sau din rezervor se poate recolta direct, umplând până la 2 cm sub dop, se închide cu dopul flaconul, se acoperă cu capacul de hârtie, apoi se notează.

Din surse locale, din apa de fântână sau izvor, probele se recoltează direct cu flaconul sau prin turnare în flacon din găleata fântânii sau izvorului. Nivelul apei din flacon trebuie să fie până la circa 2 cm sub dop, se închide cu dopul, se acoperă cu capacul de hârtie, apoi se notează.

În cazul în care apa de analizat este clorinată, înainte de recoltarea probei în flacon se adaugă 1 ml soluție de tiosulfat de Na 0,5%, pentru fiecare 100 ml apă ce urmează a fi recoltată.

Atunci când se recoltează volume mai mari de apă, ca în cazul decelării bacteriilor patogene sau a enterovirusurilor, se utilizează o găleată de 10 litri.

Se fixează pâlnia metalică pe un trepied și se așează pernita de tifon pe sita suport. Se filtrează conținutul a 10 găleți (în total 100 de litri de apă). După filtrare se scoate sita suport din pernita de tifon, se introduce pernita de tifon într-o pungă de plastic care se leagă cu sfoară și se notează cu datele necesare pentru identificarea probei (flacoanele și pungile trebuie să fie prevăzute cu etichete din leucoplast pe care se înscriu denumirea probei și data recoltării).

Transportul și păstrarea probelor

După efectuarea recoltării, probele se transportă cât mai repede posibil la laborator. Pentru a nu se modifica conținutul microbian al apei în timpul transportului, probele se vor ține la rece în truse frigorifice, mai ales în anotimpul cald. Dacă nu se pot analiza în ziua recoltării, ele pot fi păstrate maximum 24 ore, în frigider la 4°C.

17.1. Metode de analiză curentă

17.1.1. Determinarea numărului total de bacterii ce se dezvoltă la 37°C (mezofile)

Principiul metodei. Prezența bacteriilor mezofile se pune în evidență prin însămânțarea probei sau diluțiilor zecimale, prin procedeul incorporării într-un mediu nutritiv solid incubat la 37°C timp de 48 de ore, urmat de numărarea coloniilor dezvoltate. Rezultatul se exprimă prin numărul de unități formatoare de colonii (UFC) la 1 ml.

Materiale și medii de cultură

- Eprubete de 16x160 mm, sterile
- Cutii Petri cu diametrul de 10 cm, sterile

- Pipete gradate de 1 ml și de 10 ml, sterile
- Apă tamponată sterilă, soluție de lucru: într-un balon de 1000 ml se introduc 1,25 ml din soluția de rezervă (500 ml apă dist. + 34 g KH_2PO_4 , pH=7,2) și apă dist. până la semn; se sterilizează la 121°C, 20 de minute.
- Mediu geloză nutritivă cu următoarea compoziție:

Peptonă 10 g, NaCl 5 g, macerat de carne 1000 ml, agar 20 g, pH=7,2-7,4, sterilizat la 121°C, 30 de minute.

Tehnica de lucru

Din proba de apă omogenizată (prin mișcări de rotire a flaconului în plan orizontal, în ambele sensuri) se ia cu o pipetă un volum de 1 ml și se introduce într-o cutie Petri. În cazul probelor cu număr mare de bacterii este necesar să se însămânțeze și probele diluate 10^{-1} și 10^{-2} .

În fiecare cutie Petri cu proba de apă diluată sau nediluată se introduc, în mod aseptice, 15-20 ml geloză nutritivă lichiefiată (topită) și răcită la 45°C. Se omogenizează conținutul cutiilor Petri prin mișcări de rotație în plan orizontal, în ambele sensuri, după care se lasă să se solidifice geloză. Apoi cutiile Petri se pun la incubat la 37°C, cu capacul în jos, timp de 48 de ore.

După incubare se numără coloniile care s-au dezvoltat atât la suprafață cât și în interiorul gelozei, cu ochiul liber sau cu ajutorul unei lupe. Cutiile Petri care conțin peste 300 colonii nu se iau în considerație și se elimină. Calculul se realizează pe baza următoarei formule:

$$\text{Numărul total de bacterii mezofle (UFC/ml)} = \frac{\sum (n \cdot d)}{N \cdot V}$$

unde:

n - numărul de colonii ce s-au dezvoltat într-o cutie Petri;

d - inversul diluției probei însămânțate;

N - numărul de cutii Petri luate în calcul;

V - volumul probei luate în lucru, în ml.

17.1.2. Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme (coliformi totali)

Metoda tuburilor multiple

Principiul metodei. Prezența bacteriilor coliforme (coliformi totali) se pune în evidență prin testul de prezumție (=test prezumtiv) însămânțând apă sau/și diluții decimale într-un număr de flacoane și eprubete cu mediu de îmbogățire lichid, reacția pozitivă fiind evidențiată printr-un test de confirmare pe mediu solid la temperatura de 37°C, după 24 ore. Plecând de la numărul de tuburi pozitive confirmate se

calculează folosind tabelele 25 și 26, numărul probabil de bacterii coliforme (coliformi totali).

Materiale și medii de cultură

- Eprubete de 16x160 mm cu tuburi de fermentare Durham în interior, sterile
- Cutii Petri cu diametrul de 10 cm, sterile
- Apă tamponată sterilă, soluție de lucru
- Mediu:- bulion-lauryl sulfat
- Mediu bulion-lauryl sulfat dublu concentrat

Tehnica de lucru

Testul de prezumție

Pentru apa recoltată din instalațiile centrale (rețea de distribuție, rezervor) se analizează un volum de 100 ml probă din care se însămânțează 50 ml probă într-un flacon care conține 50 ml mediu bulion lauryl sulfat.

Bulionul -lauryl sulfat are următoarea compoziție:

Peptonă tripticar	20 g
Na_2HPO_4	2,75 g
NaH_2PO_4	2,75 g
NaCl	5 g
Lactoză	5 g
Lauryl sulfat de Na $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}]$	0,1 g
Apă dist.	1000 ml

Componentele se dizolvă în apă la cald, se corectează pH la 6,8, se repartizează în flacoane și eprubete cu tub de fermentație (tip Durham) și se sterilizează la 115°C, timp de 20 de minute.

Bulionul -lauryl sulfat dublu concentrat are următoarea compoziție:

Peptonă tripticar	40 g
Na_2HPO_4	5,50 g
NaH_2PO_4	5,50 g
NaCl	10 g
Lactoză	10 g
Lauryl sulfat de Na	0,2 g
Apă dist.	1000 ml

Mediul geloză-lactoză-eozină-albastru de metilen (=GEAM)

Compoziție:

Geloză nutritivă	100 ml
Lactoză	1 g
Eozină, soluție 2%	2 ml
Albastru de metilen sol. 0,5%	1,3 ml

Geloza se topește, se adaugă lactoza, soluția de eozină, soluția de albastru de metilen. Se omogenizează bine, la 90°C. Apoi se toarnă în cutii Petri.

Tehnica de lucru

Testul de prezumție

Pentru apa recoltată din instalațiile centrale (rețea de distribuție, rezervor) se analizează un volum de 100 ml apă din care se însămânțează 50 ml probă într-un flacon care conține 50 ml bulion lauryl sulfat dublu concentrat și câte 10 ml probă în 5 eprubete care conțin fiecare câte 10 ml mediu bulion lauryl sulfat dublu concentrat.

Pentru apa recoltată din surse locale (fântâni) sau alte categorii de apă decât cea potabilă, se analizează un volum de 55,5 ml probă din care se însămânțează câte 10 ml probă în 5 eprubete care conțin fiecare câte 10 ml mediu bulion-lauryl sulfat dublu concentrat, câte 1 ml probă în 5 eprubete care conțin câte 10 ml mediu bulion lauryl sulfat și câte 1 ml din diluția 10^{-1} a probei în 5 eprubete care conțin fiecare câte 10 ml mediu bulion lauryl sulfat.

În cazul când apa este poluată sau nu i se cunoaște gradul de poluare se va însămânța în continuare în același mod din diluțiile 10^{-2} , 10^{-3} etc. Flacoanele și eprubetele însămânțate se introduc în termostată și se incubează la 37°C, timp de 48 de ore.

După 24 ore se face o primă citire și trecere pe mediul geloză-lactoza-eozină-albastru de metilen pentru testul de confirmare din flacoanele și eprubetele în care se evidențiază turbiditate și gaz. Se consideră pozitive flacoanele și eprubetele în care se constată fermentarea lactozei prin prezența de gaz în tuburile de fermentare oricât de mică ar fi cantitatea de gaz degajată în eprubeta respectivă. În continuare eprubetele se mențin în termostată până la 48 de ore. După 48 de ore se face citirea definitivă și treceri pentru testul de confirmare pentru flacoanele și eprubetele în care s-a obținut o dezvoltare microbiană (turbiditate) cu sau fără gaz, cu excepția celor ce s-au confirmat la 24 de ore.

Testul de confirmare

Pentru a preciza dacă fermentarea a fost produsă de bacteriile coliforme, din fiecare flacon sau eprubetă considerate pozitive la testul de prezumție se fac însămânțări cu ansa pe mediul geloză-lactoza-eozină-albastru de metilen. Se fac dispersii cu ansa în striuri pe sectoare pentru obținerea de colonii izolate. Pe o cutie Petri se pot folosi cel mult 5 sau 6 sectoare în cazul trecerilor din eprubete și 2-4

sectoare în cazul trecerilor din flacoane. Se incubează cutiile la termostat cu capacul în jos, la 37°C, timp de 24 ore. Prezența bacteriilor coliforme (coliformi totali) se confirmă dacă s-au dezvoltat colonii caracteristice: colonii plate de culoare albastru-violet închis, cu luciu metalic sau bombate, opace, mucoase cu luciu metalic în centru sau de culoare roz cu centrul albastru-violet.

Calcularea rezultatelor

Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme în 100 ml probă se face cu valorile din tabelele 25 și 26 în funcție de cantitatea de probă analizată, luând în considerare flacoanele și eprubetele confirmate.

Calculul numărului probabil de bacterii coliforme în 100 ml probă din instalații centrale se face cu valorile tabelului 25.

De exemplu:

Cantități de probă însământate: un volum de 50 ml și 5 volume de câte 10 ml. S-au confirmat două eprubete cu câte 10 ml probă.

Rezultatul: două bacterii coliforme (coliformi totali) în 100 ml probă.

Calculul numărului probabil de bacterii coliforme în 100 ml probă din surse locale și alte categorii de apă decât cele potabile se face cu valorile din tabelul 26.

Exemplu:

Cantități de probă însământate: 5 volume de câte 1 ml și 5 volume de câte 1 ml din diluția 10^{-1} . S-au confirmat 5 eprubete cu câte 10 ml probă, 3 eprubete cu câte 1 ml și o eprubetă cu 1 ml din diluția 10^{-1} . Rezultatul: un număr probabil de 109 bacterii coliforme (coliformi totali) în 100 ml probă.

În cazul în care s-au însământat diluții de probă mai mari de 10^{-1} pentru citirea tabelului 26 se ia în considerare, seria de 3 diluții succesive (cu gradul de diluție cel mai mare) astfel aleasă, încât prima diluție din această serie să fie total sau parțial pozitivă și precedată numai din serii total pozitive. Numărul probabil de bacterii coliforme (coliformi totali) în 100 ml se obține prin adăugarea la valoarea citită în tabel pentru seria de diluții luată în calcul a unui număr de zerouri egal cu diferența dintre prima diluție luată în calcul și volumul însământat inițial.

Exemplu: s-au confirmat 5 eprubete din diluția 10^{-1} , 3 eprubete din diluția 10^{-2} și o eprubetă din diluția 10^{-3} . Rezultatul: un număr probabil de 10.900 bacterii coliforme (coliformi totali) în 100 ml probă.

Metoda membranei filtrante (metoda rapidă)

Această metodă se aplică în următoarele cazuri când trebuie determinat rapid numărul de bacterii coliforme, când transportul probelor până la laborator durează mai mult timp și este necesară însămânțarea probelor la locul de recoltare; în cazul unui număr mare de probe, pentru economie de timp și materiale. Metoda nu se pretează pentru probele care conțin o cantitate mare de suspensii sau turbiditate mare (alge, mâl).

Materiale și medii de cultură

- Membrane filtrante cu $\phi 30-45$ mm și mărimea porilor de $0,45-0,7 \mu m$
- Rondele de hârtie de filtru cu porozitate mare, cu ϕ egal cu cel al suportului filtrului
- Apă tamponată sterilă, soluție de lucru
- Pompă de vid
- Cutii Petri sterile ($\phi 10$ cm)
- Capsule de porțelan
- Cilindri gradați de 50 ml și 100 ml, sterili
- Mediu geloză-lactoză cu fucsină și sulfat de Na (mediu Endo)
compus din:
 - Geloză 100 ml
 - Fucsină sol.saturată 0,5 ml
 - Sulfat de Na, sol. 10% 1,25 ml
 - Lactoză sol. 30% sterilă 5 ml

Tabelul 25

Numărul probabil de bacterii coliforme

Numărul flacoanelor sau eprubetelor pozitive din:		Numărul probabil de indicator bacteriologic /100 ml probă
Un flacon conținând 50 ml probă	Cinci eprubete conținând 10 ml probă	
0	0	0
0	1	1
0	2	2
0	3	4
0	4	5
0	5	7
1	0	2
1	1	3
1	2	6
1	3	9
1	4	16
1	5	peste 16

Tabel 26

Numărul probabil de bacterii coliforme

Numărul eprubetelor pozitive din			Numărul eprubetelor pozitive din:			Nr. proba- bil de in- dicator bacterio- logic /100 ml probă	Nr. proba- bil de in- dicator bacterio- logic /100 ml probă
5 epr. cu 10 ml probă	5 epr. cu 1 ml probă	5 epr. cu 1 ml probă diluție 10^{-1}	5 epr. cu 10 ml probă	5 epr. cu 1 ml probă	5 epr. cu 1 ml probă diluție 10^{-1}		
0	0	0	4	2	1	sub 2	26
0	0	1	4	3	0	2	27
0	1	0	4	3	1	2	33
0	2	0	4	4	0	4	34
1	0	0	5	6	0	2	23
1	0	1	5	0	1	4	31
1	1	0	5	0	2	4	43
1	1	1	5	1	0	6	33
1	2	0	5	1	1	6	46
2	0	0	5	1	2	5	63
2	0	1	5	2	0	7	49
2	1	0	5	2	1	7	70
2	1	1	5	2	2	9	94
2	2	0	5	3	0	9	79
2	3	0	5	3	1	12	109
3	0	0	5	3	2	8	141
3	0	1	5	3	3	11	175
3	1	0	5	4	0	11	130
3	1	1	5	4	1	14	172
3	2	0	5	4	2	14	221
3	2	1	5	4	3	17	278
3	3	0	5	4	4	17	345
4	0	0	5	5	0	13	240
4	0	1	5	5	1	17	348
4	1	0	5	5	2	17	542
4	1	2	5	5	4	26	1609
4	2	0	5	5	5	22	peste 1609

La început se sterilizează suportul pentru filtru, la 121°C , 30 de minute, la fel și flaconul conic cu tub lateral. Membranele filtrante se sterilizează conform indicațiilor de lucru.

Mărima volumelor filtrate dintr-o probă se apreciază în funcție de poluarea apei, astfel ca pe o membrană filtrantă să se obțină 20-80 colonii.

- Din instalațiile centrale (rezervor, rețea de distribuție) se ia un volum de 100 ml probă. Pe o rondelă de hârtie de filtru se filtrează un volum de 50 ml probă, pe alte două runde se filtrează două volume de câte 25 ml probă.

- Din sursele locale de apă se filtrează un volum de 25 ml, două volume de câte 10 ml și un volum de 5 ml, în total 50 ml probă. La nevoie, se pot folosi și diluții. În cazul în care volumul probei filtrate este sub capacitatea suportului pentru filtru, se toarnă întâi o cantitate de soluție de lucru de apă tamponată sterilă.

- Pentru fiecare probă se folosește un alt suport pentru filtru. Diferitele volume din aceeași probă se filtrează pe același dispozitiv de filtrare, schimbând după filtrarea fiecărui volum de probă numai hârtia de filtru și membrana filtrantă iar suportul pentru filtru se clătește cu apă tamponată sterilă, soluție de lucru.

- Filtrarea se începe cu cel mai mic volum din proba respectivă și se confirmă cu celelalte volume în ordine crescătoare.

Modul de lucru propriu-zis. Pe placa suport pentru filtru se așează rondela de hârtie de filtru sterilă, se umezește cu apă tamponată sterilă soluția de lucru și deasupra se pune cu pensă o membrană filtrantă.

Dispozitivul de filtrare se racordează la sistemul de vid prin intermediul flaconului tampon și se filtrează sub vid slab (picătură cu picătură), folosind pentru fiecare volum de probă, o altă membrană filtrantă. După filtrarea fiecărui volum de probă, se spală interiorul suportului filtru cu o cantitate de cel puțin 30 ml apă tamponată sterilă, filtrând sub vid. Se repetă operația de spălare de încă două ori.

Cu o pensetă flambată se ridică membrana filtrantă și se depune cu suprafața care a fost în contact cu proba filtrată pe mediul geloză-lactoză cu fucsină și sulfat de Na turnat în cutii Petri, evitând formarea de bule de aer între membrană și suprafața mediului. Dacă totuși s-au format bule, se ridică membrana filtrantă și se reasează cu grijă. Cutiile Petri cu membranele filtrante se introduc cu capacul în jos în termostat pentru incubare la 37°C, timp de 24 ore. După incubare se examinează prezența coloniilor caracteristice de bacterii coliforme, folosindu-ne de o lupă, fie direct în lumina obișnuită, fie în lumină fluorescentă.

Calculul rezultatelor

Numărul de bacterii coliforme (coliformi totali) se calculează după formula:

$$\text{Bacterii coliforme} = \frac{n_1 + n_2 + n_3}{V_1 + V_2 + V_3} \cdot 100 = \text{coliformi totali/100 ml}$$

în care:

- n_1, n_2, n_3 = numărul de colonii caracteristice dezvoltate pe fiecare membrană filtrantă
- V_1, V_2, V_3 = volumele filtrate din aceeași probă în ml

17.1.3. Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme termotolerante (=coliformi fecali)

Principiul metodei

Prezența bacteriilor coliforme termotolerante (coliformi fecali) se pune în evidență plecând de la flacoanele și eprubetele pozitive în testul de prezumție pentru bacteriile coliforme (coliformi totali) prin confirmare în mediul selectiv lichid, la temperatura de 44°C în 24 ore. Luând în considerare numărul de tuburi pozitive la temperatura de 44°C se calculează, folosind valorile din tabelele 25 și 26 numărul probabil de bacterii coliforme termotolerante (coliformi fecali).

Materiale și medii de cultură

- Eprubete de 16x160 mm, cu tuburi de fermentare, sterile
- Pipete Pasteur sterile
- Mediu bulion-bilă-lactoză-bromcrezol purpur (=mediu MacConkey), cu următoarea compoziție:

Peptonă tripticar	20 g
Lactoză	10 g
Săruri biliare	1,5 g
NaCl	5 g
Apă dist.	1000 ml
Bromcrezol purpur sol. 1% în alcool etilic 96°	12 ml

pH 7,2-7,4 (stabilit înainte de adăugarea de bromcrezol purpur).

Mediul se repartizează în eprubete cu tub de fermentare. Se sterilizează la 115°C, timp de 15 minute.

- Mediu bulion-bilă-lactoză-verde brilliant (=mediu BBLV) cu următoarea compoziție:

Peptonă	10 g
Lactoză	10 g
Bilă uscată de bovine	20 g
Verde brilliant	0,0133 g
Apă dist.	1000 ml

Se adaugă în apă peptona și bila. Se sterilizează la 110°C, 20 de minute. Se ajustează pH la 7,3. Se filtrează. Se adaugă lactoza și verdele brilliant. Se omogenizează. Se repartizează câte 10 ml în eprubete cu tuburi de fermentare și se sterilizează la 115°C, 15 minute.

Tehnica de lucru

Pentru confirmarea bacteriilor coliforme termotolerante, din aceleași flacoane și eprubete considerate pozitive la testul de prezumție din care s-au făcut treceri pentru confirmarea bacteriilor coliforme (coliformi totali) se trec cu pipeta Pasteur, una sau două picături, în eprubete care conțin fie

mediu bulion-bilă-lactoză-bromcrezol purpur sau mediu bulion-bilă-lactoză-verde brilliant.

Probele se incubează la 44°C timp de 24 ore. Virarea culorii mediului în galben (acidifiere) concomitent cu producerea de gaz ca urmare a fermentării lactozei, indiferent de cantitatea degajată în tuburile de fermentare indică prezența bacteriilor coliforme termotolerante (coliformi fecali).

Calculul: se face folosind tabelele 25 și 26, ca în cazul determinării numărului probabil de bacterii coliforme (coliformi totali).

17.1.4. Determinarea numărului probabil de streptococi fecali

Metoda tuburilor multiple

Principiul metodei. Prezența streptococilor fecali se pune în evidență prin testul de prezumție însămânțând proba și/sau diluții decimale într-un număr de flacoane și eprubete cu mediu de îmbogățire lichid la 37°C, reacția pozitivă fiind evidențiată printr-un test de confirmare într-un mediu selectiv lichid la temperatura de 44°C, timp de 48 de ore. Plecând de la numărul de tuburi pozitive confirmate se calculează numărul probabil de streptococi fecali pe baza tabelelor 25 și 26.

Materiale și medii de cultură

- Eprubete de 16x160 mm, sterile
- Eprubete de 12x120 mm, sterile
- Flacoane de 250 și 300 ml, sterile
- Pipete gradate de 1 ml și 10 ml, sterile
- Pipete Pasteur, sterile
- Apă tamponată sterilă soluție de lucru
- Mediu: bulion-azidă de Na cu compoziția următoare:

- Extract de carne	4,5 g
- Proteoză-peptonă	15 g
- Glucoză	7,5 g
- NaCl	7,5 g
- Azidă de Na	0,2 g
- Apă dist.	1000 ml

Componentele se dizolvă în apă la cald, se corectează pH la 7,2-7,4. Se repartizează în flacoane și eprubete și se sterilizează la 115°C, timp de 20 de minute.

- Mediu: bulion-azidă de Na dublu concentrat: se dublează cantitățile de substanțe
 - Mediu: bulion-azidă de Na-bromcrezol purpur, pentru confirmare este compus din:
 - Proteoză-peptonă 20 g
 - Glucoză 5 g
 - NaCl 5 g
 - K_2HPO_4 2,7 g
 - KH_2PO_4 2,7 g
 - Azidă de Na 0,4 g
 - Bromcrezol purpur sol.1,6% în alcool etilic 98% 2 ml
 - Apă dist. 1000 ml
- pH 7,2-7,3 (stabilit înainte de adăugarea de bromcrezol purpur).

Se repartizează, în eprubete mici, câte 2-3 ml/eprubetă și se sterilizează la 115°C, 30 de minute.

Mediu: agar-glucoză-azidă de Na-trifenil-tetrazol-clorură
(-mediu Slanetz-Bartley) compus din:

- Triptoză 20%
- Extract de drojdie 5 g
- Glucoză 2 g
- K_2HPO_4 4 g
- Azidă de Na 0,4 g
- Agar-agar 10 g
- 2,3,5-Trifeniltetrazoliu clorură (TTC) sol.1% 10 ml
- Apă distilată 1000 ml

pH - 7,2 (stabilit înainte de adăugarea TTC). Sterilizarea se realizează prin filtrare.

Tehnica de lucru

Testul de prezumție. Pentru apa recoltată din instalațiile centrale se însămânțează un volum de 100 ml probă în mediu bulion-azidă de Na-dublu concentrat, din care se însămânțează 50 ml într-un flacon care conține 50 ml mediu și câte 10 ml probă în 5 eprubete care conțin fiecare câte 10 ml mediu.

Pentru apa recoltată din surse locale și alte categorii de apă decât cele potabile se însămânțează volumul de 55,5 ml probă din care câte 10 ml în 5 eprubete cu 10 ml mediu dublu concentrat, câte 1 ml în 5 eprubete tot cu 10 ml mediu și câte 1 ml din diluția 10^{-1} a probei în alte 5 eprubete ce conțin 10 ml mediu bulion-azidă de Na. Incubarea se face la 37°C timp de 48 de ore. La 48 ore se face citirea testului de prezumție și se realizează

treceți pentru testul de confirmare din toate flacoanele și eprubetele unde se constată apariția turbidității cu sau fără sediment.

Testul de confirmare

Când confirmarea streptococilor fecali se face în mediu lichid, se trec cu o pipetă Pasteur una sau două picături din fiecare flacon sau eprubetă considerate pozitive la testul de prezumție, în câte o eprubetă cu mediu bulion-azidă de Na și bromcrezol purpur. Se incubează la 44,5°C, timp de 24 ore. Virarea culorii mediului în galben cu sediment pe fundul eprubetei atestă prezența streptococilor fecali în apă.

Când confirmarea streptococilor fecali se face pe mediu solid, din fiecare flacon sau eprubetă considerate pozitive se fac însămânțări cu ansa pe mediu agar-glucoză-azidă de Na-trifenil tetrazol clorură. Se fac dispersii cu ansa în striuri, pe sectoare, pentru obținerea de colonii izolate. Cultiile Petri însămânțate se incubează cu capacul în jos în termostat la 44,5°C, timp de 48 ore. Coloniile de streptococi fecali care se dezvoltă sunt rotunde, cu marginea regulată, cu aspect mucos și sunt de culoare roz-roșu-închis.

Calculul rezultatelor se face ca și la determinarea numărului probabil de coliformi totali.

Metoda membranei filtrante

Se realizează ca și în cazul determinării numărului de coliformi totali cu deosebirea că în locul mediului Endo se folosește mediul agar glucoză-azidă de Na-trifenil tetrazol clorură.

17.2. Metode de analiză complementară

17.2.1. Determinarea numărului total de bacterii ce se dezvoltă la 22°C (mezofile)

Se realizează ca și în cazul determinării numărului total de bacterii ce se dezvoltă la 37°C (mezofile) cu deosebirea că incubarea se face la 22°C, timp de 48 de ore.

17.2.2. Determinarea numărului probabil de clostridii sulfite reducătoare și de bacterii *Clostridium perfringens*

(metoda tuburilor multiple)

Principiul metodei. Prezența clostridiilor sulfite reducătoare se pune în evidență prin însămânțarea probei și/sau diluțiilor decimale într-un număr de eprubete cu mediu de îmbogățire lichid și incubarea la 37°C, timp de 48 de ore, în condiții de anaerobioză. Prezența bacteriilor *Clostridium perfringens* se pune în evidență prin confirmarea eprubetelor cu reacția pozitivă pentru prezența clostridiilor sulfite-reducătoare în mediu cu lapte la 37°C, timp de 48 de ore. Plecând de la numărul de eprubete

pozitive se calculează folosind tabelele 25 și 26, numărul probabil de clostridii sulfid reducătoare și respectiv de bacterii *Clostridium perfringens*.

Materiale și medii de cultură

- Eprubete de 25x250 mm, sterile
- Eprubete de 18x180 mm și 16x160 mm, sterile
- Pipete gradate de 2 ml, 10 ml, 25 ml, sterile
- Apă tamponată sterilă soluție de lucru
- Mediu bulion pentru clostridii sulfid reducătoare cu următoarea

compoziție:

- Peptonă	10 g
- Extract de carne	10 g
- Extract de drojdie	1,5 g
- Acetat de Na	5 g
- Amidon solubil	1 g
- L(-)Cisteină	0,5 g
- Citrat de Fe /III/ sol. 7%	10 ml
- Resazurină sau albastru de metilen	0,002 g
- Sulfid de Na, sol.4%	10 ml
- Apă dist.	1000 ml

pH - 7,1-7,2. Se sterilizează la 115°C, 20 de minute.

- Mediu bulion pentru clostridii sulfid reducătoare dublu concentrat (se dublează toate cantitățile de substanțe).

- Mediu cu lapte, ce conține:

- Lapte praf degresat	100 g
- Apă dist.	1000 ml

Se repartizează câte 10 ml în eprubete de 16/160 mm și se sterilizează la 105°C, timp de 20 minute. Înainte de folosire mediul se regenerează prin menținere în baia de apă la temperatura de 100°C, timp de 15-20 de minute, urmată de răcire bruscă.

- Ulei de parafină steril

- Baie de apă

- Termostat.

Tehnica de lucru

Pentru determinarea numărului probabil de clostridii sulfid reducătoare de apă la 60°C. Temperatura este ridicată treptat și menținută timp de 10-15 minute la 80°C pentru a distruge toate formele vegetative ale bacteriilor din probă.

Pentru apa recoltată din instalațiile centrale se însămânțează un volum de 100 ml probă în mediu bulion pentru clostridii sulfid reducătoare

dublu concentrat, conform testului de prezumție de la determinarea numărului de coliformi totali.

Pentru apa recoltată din surse locale și alte surse decât cele potabile se procedează ca și în cazul coliformilor totali. Volumele de 10 ml probă se însămânțează în mediu bulion pentru clostridii sulfid reducătoare dublu concentrat, iar volumele de 1 ml și diluții decimale în mediu bulion pentru clostridii sulfid reducătoare (simplu concentrat). Înainte de însămânțare, mediul este regenerat prin menținerea în baie de apă la temperatură de 100°C, timp de 15-20 de minute și răcit brusc. Se folosesc pipete de capacitate mai mare decât volumul ce trebuie însămânțat, care se introduc în profunzimea mediului, lăsând proba să cadă liber, fără a sufla în ele.

Un strat de 0,5-1 ml ulei de parafină se adaugă la suprafața mediului însămânțat pentru a menține condițiile de anaerobioză.

Incubarea se face la 37°C, 48 de ore. Citirea rezultatelor se face la 24 ore și se completează cu citirea definitivă a testului după 48 de ore. Înnegrirea mediului atestă prezența clostridiilor sulfid reducătoare. Determinarea numărului probabil de clostridii sulfid reducătoare în 100 ml probă de apă se face conform modelului de la numărul de coliformi totali, luându-se în considerare eprubetele în care a avut loc înnegrirea mediului.

Confirmarea bacteriilor Clostridium perfringens

Din fiecare eprubetă în care a avut loc înnegrirea mediului se transferă cu o pipetă de 2 ml un volum de 1 ml în același mod ca la însămânțarea în mediu bulion pentru clostridii sulfid reducătoare, în câte o eprubetă cu lapte regenerat menținută în baie de apă la temperatura de 100°C, timp de 15-20 de minute, apoi răcit brusc. Probele astfel însămânțate sunt incubate la temperatura de 37°C, timp de 48 de ore. Citirile se fac la 24 ore și se completează cu citirea definitivă după 48 de ore. Apariția cheagului alveolar confirmă prezența bacteriilor *Clostridium perfringens*.

Determinarea numărului probabil de bacterii *Clostridium perfringens* în 100 ml probă se face conform modelului de la determinarea numărului probabil de coliformi totali, luându-se în considerare numai eprubetele cu cheag alveolar.

17.2.3. Determinarea numărului probabil de bacterii *Pseudomonas aeruginosa* (metoda tuburilor multiple)

Principiul metodei. Prezența speciei *Pseudomonas aeruginosa* se pune în evidență prin testul de prezumție însămânțând apă și/sau diluții decimale într-un număr de flacoane și eprubete cu mediu de îmbogățire lichid și incubând la temperatura de 37°C, timp de 48 de ore. Reacția pozitivă este apoi evidențiată printr-un test de confirmare pe medii solide favorizând producerea de pigmenți caracteristici speciei și la nevoie prin teste suplimentare. Plecând de la numărul de flacoane și eprubete pozitive confirmate se calculează numărul probabil de bacterii *Pseudomonas aeruginosa* folosind tabelele 24 și 25.

Materiale și medii de cultură

- Eprubete 16x160 mm, sterile
- Flacoane de 250 și 300 ml, sterile
- Pipete gradate de 1 ml și 10 ml, sterile
- Plăci Petri cu ϕ de 10 cm, sterile
- Apă tamponată sterilă soluție de lucru
- Mediu bulion lauryl sulfat (v. determinarea coliformilor totali)
- Mediu Cetrimid agar:

Peptonă tripticar	20 g
K ₂ SO ₄	10 g
MgCl ₂	1,4 g
Glicerină	10 g
Agar-agar	15 g
Cetrimid (Cetyltrimetilamoniu bromură (C ₁₉ H ₄₂ BrN))	0,3 g
Apă dist.	1000 ml
pH 7,2.	

Se dizolvă componentele la cald în apă. Se filtrează prin vată, la cald. Se repartizează în baloane și se sterilizează la 120°C, timp de 20 de minute. După sterilizare se toarnă în cutii Petri. Se lasă să se solidifice și cutiile se păstrează la rece (4°C) cel mult 4-5 zile. Mediul se poate folosi și fără cetrimid, acesta fiind înlocuit de bromocet.

Mediu *Pseudomonas*-agar F cu compoziția următoare:

Peptonă tripticar	20 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1,5 g
Glicerină	10 g
Agar-agar	15 g
Apă dist.	1000 ml

Mediu apă peptonată 1%-trifenil tetrazol clorură. compus din:

Apă peptonată soluție 1% 90 ml

2,3,5-Trifeniltetrazol clorură (TTC) sol. 1% 10 ml

La 90 ml apă peptonată sterilă se adaugă în mod steril 10 ml soluție TTC. Mediul se repartizează steril, câte 3-4 ml în eprubete de hemoliză (sterilitatea mediului se controlează pe medii înclinate cu geloză nutritivă).

Tehnica de lucru

Testul de prezumție. Pentru apele minerale îmbuteliate și apele potabile furnizate de instalațiile centrale urbane și rurale se însămânțează un volum de 100 ml probă (v. nr. de coliformi totali). Pentru apa clorinată din bazinele de înot și pentru apa furnizată din surse locale se însămânțează un volum de 55,5 ml probă de apă (v. numărul total de bacterii coliforme).

Flacoanele și eprubetele însămânțate se incubează la 37°C, timp de 48 de ore. Absența creșterii microbiene obligă la prelungirea incubării până la 72 ore. Se consideră pozitive eprubetele și flacoanele care prezintă turbiditate cu sau fără peliculă la suprafața mediului.

Testul de confirmare. Din eprubetele și flacoanele considerate pozitive în prezumție se fac dispersii cu ansa în striuri, pe sectoare în paralel pe două medii: Cetrimid-agar și *Pseudomonas*-agar F. Se incubează cutiile Petri cu capacul în jos la 37°C, timp de 24 ore după care se face citirea și notarea rezultatului pentru fiecare sector de pe cutie. Caracteristica esențială a coloniilor de *Pseudomonas aeruginosa* pe mediul Cetrimid-agar este culoarea albastră-verde dată de piocianină, iar pe *Pseudomonas*-agar F culoarea galbenă sau galben-verzui dată de fluoresceină. Culoarea coloniilor se intensifică la temperatura camerei și lumina naturală. Cultura de *Pseudomonas aeruginosa* degajă un miros aromatic caracteristic de trimetilamină (asemănător florilor de tei).

Interpretarea rezultatelor. Formarea piocianinei pe mediul Cetrimid-agar și o fluoresceinei pe mediul *Pseudomonas*-agar F sunt caracteristici de confirmare a speciei *Pseudomonas aeruginosa*.

Absența piocianinei pe mediul Cetrimid-agar și absența fluoresceinei pe mediul *Pseudomonas*-agar F indică absența speciei *Pseudomonas aeruginosa*.

Absența piocianinei pe mediul Cetrimid-agar dar cu producerea de fluoresceină pe mediul *Pseudomonas*-agar F necesită pentru diferențierea speciei *Ps. aeruginosa* de grupul pseudomonadelor fluorescente, teste suplimentare:

- dezvoltarea la 42°C în tuburi cu geloză înclinată după incubare timp de 24-72 ore,
- dezvoltarea pe mediul apă peptonată 1%-trifenil tetrazol clorură 1% cu incubare la 37°C timp de 24-48 ore.

Tulpinile de *Ps. aeruginosa* se dezvoltă reducând TPC la TTF, formând vâl și sediment de culoare roșie.

Dacă reacția cu TTC este negativă se infirmă specia *Ps. aeruginosa*. Determinarea numărului probabil de bacterii *Ps. aeruginosa* în 100 ml probă de apă se face luându-se în considerare flacoanele și eprubetele confirmate, conform exemplului de la coliformii totali.

17.2.4. Determinarea numărului probabil de bacteriofagi enterici: anti *Salmonella typhi* AVI, anti *Escherichia coli* Bruxelles și anti *Vibrio cholerae* grup 0:1 (metoda tuburilor multiple)

Principiul metodei. Prezența bacteriofagilor enterici se pune în evidență prin însămânțarea apei și/sau diluțiilor decimale în flacoane și eprubete cu mediu de îmbogățire lichid împreună cu tulpinile de bacterii lizosensibile incubate la 37°C urmată de separarea bacteriofagilor prin inactivarea bacteriilor și testarea lizei bacteriofagice. Numărul probabil de bacteriofagi enterici se calculează pe baza datelor din tabelele 25 și 26

Materiale și medii de cultură

- Eprubete 16x160 mm, sterile
- Flacoane de 250 și 300 ml, sterile
- Pipete gradate de 1 ml și 10 ml, sterile
- Cutii Petri cu ϕ de 10 cm, sterile
- NaOH, soluție 10%
- Mediu bulion tripticar:

- Peptonă tripticar	20 g
- NaCl	3 g
- Apă dist.	1000 ml
- pH - 7,2-7,3.

Sterilizarea se face la 120°C, timp de 20 de minute

- Mediu bulion tripticar dublu concentrat
- Mediu geloză nutritivă (v. pag. 222).
- Mediu Dorset (pentru păstrarea tulpinii lizosensibile de *Salmonella typhi* AVI) cu compoziția:

- | | |
|---------------------|---------|
| Ou | 3 părți |
| Ser fiziologic 0,9% | 1 parte |

Se spală oul cu săpun și apă, cu peria și se scurge pe hârtie. Se introduce oul într-un pahar steril cu alcool etilic 96° și se ține 15 minute.

Apoi se sparge oul și se introduce într-un cilindru gradat steril, completându-se cu ser fiziologic steril în raport de 3 părți ou, o parte ser fiziologic. Se toarnă totul într-un balon cu perle sterile și se omogenizează. Se filtrează prin tifon steril. Se repartizează câte 6 sau 7 ml, în eprubete. Se sterilizează în baie de nisip 2 ore, la 80-90°C., în prima zi, respectiv 60 minute în ziua a doua și a treia. Tuburile se țin înclinate și pentru coagulare.

- Mediu Universal OMS (pentru păstrarea tulpinilor lizosensibile de *E.coli* Bruxelles și *Vibrio cholerae*) cu compoziția

Bacto-peptonă	10 g
Extract de carne	3 g
NaCl	5 g
Agar	4 g
Apă distilată	1000 ml

pH = 7,2-7,4. Se repartizează câte 3-4 ml, în tuburi de 12x120 mm și se sterilizează în coloană dreaptă la 120°C, 20 de minute.

- Tulpini test lizosensibile: *Escherichia coli* Bruxelles (I.C. 10164), *Salmonella typhi* AVI (I.C.10799) și *Vibrio cholerae* grup 0:1 (I.C.Eltor Mac).

Tehnica de lucru

Însămânțarea probei. Se decelerează prezența a 3 bacteriofagi enterici folosind trei serii de flacoane și eprubete pentru fiecare probă. Pentru apa recoltată din instalații centrale se însămânțează un volum de 100 ml probă, conform modelului de la coliformii totali. Pentru apa din surse locale sau alte categorii de apă decât cele potabile, se însămânțează volumul de 55,5 ml probă conform modelului de la coliformi totali. Volumele de 10 ml probă se însămânțează în mediu bulion tripticar dublu concentrat iar volumele de 1 ml și diluțiile decimale în mediu bulion tripticar.

În cazul decelării bacteriofagului anti *Vibrio cholerae* grup 0:1, după ce s-au însămânțat probele conform schemei de însămânțare de la coliformii totali, se aduce pH-ul la 9 cu soluție de NaOH 10%, punând circa 0,2 ml soluție pentru eprubete și circa 0,5 ml soluție pentru flacoane.

Îmbogățirea cu tulpini lizosensibile. Într-o serie de flacoane și eprubete se introduc câte 1 ml pentru flacoane și câte 0,2 ml pentru eprubete, din cultura tânără de 2-3 ore de *Salmonella typhi* AVI în bulion tripticar. În a doua serie, aceleași volume din cultura de 2-3 ore de *Escherichia coli* Bruxelles, iar în cea de a treia serie, cu pH-ul corectat la 9 se introduc aceleași volume din cultura de 2 ore de *Vibrio cholerae* grup 0:1.

Incubarea se face la 37°C, timp de 16-18 ore.

Separarea bacteriofagilor de bacterii. Separarea se realizează prin menținerea flacoanelor și eprubetelor în apă încălzită la 56-58°C, timp de 50 de minute.

Testarea lizei bacteriofagice. Se folosesc două cutii Petri cu geloză nutritivă (în caz că se lucrează cu mai multe diluții se folosesc 4 cutii). Cu o ansă cu diametrul buclei de 3 mm se etalează pe o cutie Petri cultura de 2-3 ore de *Salmonella typhi* AVI și pe cealaltă cutie Petri cultura de *E.coli* Bruxelles, sub formă de arii rotunde de circa 1 cm diametru.

Numărul ariilor trebuie să corespundă numărului flacoanelor și eprubetelor care se testează, notate corespunzător pe cutia Petri. Se lasă 5 minute să se imbibe cultura în geloză nutritivă. Se depune apoi, cu ansa cu bucla de 2 mm diametru câte o picătură din conținutul fiecărui flacon și eprubetă care au fost îmbogățite cu *Salmonella typhi* AVI, în mijlocul fiecărei arii de cultură de *Salmonella typhi* AVI. La fel se procedează și pentru a doua serie de flacoane și eprubete care au fost îmbogățite cu *E.coli* Bruxelles, flambând cu atenție ansa după fiecare depunere de picătură. Se lasă să se imbibe în geloză nutritivă picăturile depuse. (Se recomandă ca geloză nutritivă să fie repartizată în cutii Petri cu una sau două zile înainte de folosire).

Pentru a treia serie de flacoane și eprubete, îmbogățită de cultura tânără de 2 ore de *Vibrio cholerae* grup 0:1 se procedează astfel: se inundă o cutie Petri cu geloză nutritivă (în caz că se lucrează cu mai multe diluții se folosesc două cutii Petri), cu cultură tânără de 2 ore, se scoate excesul cu pipeta Pasteur și se lasă să se usuce cu capacul întredeschis lângă flacără. Se depune apoi câte o picătură cu ansa cu diametrul buclei de 2 mm, din conținutul fiecărui flacon sau eprubetă care au fost îmbogățite cu aceeași cultură, flambând cu atenție ansa după fiecare depunere de picătură. Se lasă să se imbibe în geloză nutritivă picăturile depuse timp de 5-10 minute. (Se recomandă ca geloză nutritivă să fie repartizată în cutii Petri în ziua folosirii lor și uscare înainte de folosire timp de 30-45 minute).

Incubarea II. Incubarea cutiilor Petri se face în termostat la 37°C, timp de 4-6 ore pentru bacteriofagii anti *E.coli* Bruxelles și anti *Salmonella typhi* AVI și timp de 24 ore pentru bacteriofagul anti *Vibrio cholerae* grup 0:1.

Citirea lizei bacteriofagice se face cu ochiul liber sau cu lupa:

- pentru bacteriofagii anti *Salmonella typhi* AVI și anti *E.coli* Bruxelles după 4-6 ore de la incubare și a doua zi, după o păstrare la 4°C a cutiilor Petri;

- pentru bacteriofagii anti *Vibrio cholerae* grup 0:1 după 24 ore de incubare.

Notarea rezultatelor. Se notează rezultatul pentru fiecare flacon și eprubetă în parte astfel:

- PI (Plaje /izolate) când apar pe suprafața de testare sub forma unor zone de liză, de diverse dimensiuni, rotunde, clare, izolate;
- LSC (Liză Semiconfluentă) când apar pe suprafața de testare mai multe plaje care confluează, între acestea fiind zone de cultură crescută;
- LC (Liză Confluentă) când în interiorul suprafeței de testare nu se constată creșterea culturii, aria de liză fiind clară;
- LO (Liză Opacă) când interiorul suprafeței de testat este acoperit de o creștere secundară a culturii înconjurată de un inel de liză complet sau parțial. Cultura secundară crescută este dată de multiplicarea variantelor fagorezistente. Se consideră reacție pozitivă oricare din aspectele de liză mai sus enumerate.

Calculul. Determinarea numărului probabil de bacteriofagi anti *E.coli* Bruxelles (colifagi), anti *Salmonella typhi* AVI și anti *Vibrio cholerae* grup 0:1 în 100 ml probă de apă se face conform modelului de la determinarea numărului de coliformi totali.

Păstrarea și pregătirea tulpinilor lizosensibile. Tulpina lizosensibilă de *Salmonella typhi* AVI se păstrează la 4°C pe mediul Dorset înclinat. Periodic, la 3-4 luni tulpina stocată se controlează pentru viabilitate prin două sau trei subculturi pe geloză nutritivă 1.7% înclinată și pentru puritate prin frotiu colorat Gram, din care se refac culturi stoc pe mediul Dorset.

Din subculturile de pe geloză nutritivă înclinată se verifică și cantitatea antigenului Vi, cu ser aglutinat anti *Salmonella* Vi prin tehnica aglutinării pe lamă (ser aglutinant anti-*Salmonella* Vi, titrul pentru aglutinarea pe lamă 1/20). Prezența unei aglutinări intense confirmă calitatea antigenului Vi. Absența aglutinării slabă denotă alterarea antigenului Vi, tulpina fiind necorespunzătoare pentru determinarea bacteriofagilor din apă. În această situație se folosește o nouă tulpină de *Salmonella typhi* AVI.

Înainte de fiecare determinare, din tulpina stocată se fac subculturi de 18-24 ore pe geloză nutritivă înclinată, pentru antrenare. Din acestea se fac culturi de 18-24 ore în bulion tripticar, din care se obțin culturi, în același mediu, de 2-3 ore, cu care se lucrează în mod curent.

Tulpina lizosensibilă de *E.coli* Bruxelles se păstrează fie pe geloză nutritivă dreaptă fie preferabil pe mediul universal OMS, la 4°C.

Periodic la 3-4 luni, tulpina stocată se controlează pentru viabilitate și pentru puritate prin două sau trei subculturi pe geloză nutritivă înclinată și frotiu colorat Gram din care apoi se refac culturi stoc pe geloză nutritivă dreaptă sau pe mediul universal OMS.

Înainte de fiecare determinare se antrenează tulpina de *E.coli* Bruxelles, procedându-se la fel ca și cu tulpina de *Salmonella typhi* AVI.

Tulpina lizosensibilă de *Vibrio cholerae* grup 0:1 se păstrează pe mediul universal OMS, la temperatura camerei și la întuneric.

Cu două zile înainte de fiecare determinare, din tulpina stocată se fac subculturi pe geloză în cutie Petri. Din acestea se fac culturi tinere de două ore cu care se lucrează în mod curent.

17.2.5.Determinarea numărului probabil de bacteriofagi enterici anti

E.coli Bruxelles (metoda numărării unităților formatoare de plaje)

Principiul metodei. Decalarea directă a bacteriofagilor enterici anti *E.coli* Bruxelles în 100 ml probă se realizează prin numărarea plajelor într-un singur strat de agar amestecând 100 ml probă cu mediu agar conținând cationi bivalenți și tulpina lizosensibilă *E.coli* Bruxelles urmată de repartizarea amestecului în cutii Petri sterile.

Materiale și medii de cultură

- Flacoane de 250 ml, sterile
- Pipete de 1 ml, 5 ml, sterile
- Cutii Petri din plastic cu ϕ de 10 cm
- Mediu agar pentru colifagi cu compoziția:

Peptonă	12 g
Extract de carne	14 g
NaCl	4 g
Extract de drojdie	1 g
Na_2CO_3	1 g
MgCl_2	1 g
Agar	12 g
Apă dist.	1000 ml

Se dizolvă componentele la cald, se filtrează, se corectează pH la 7,2. Se repartizează în volume de 100 ml în flacoane, se sterilizează la 120°C, timp de 20 de minute și se păstrează la 4°C.

- Soluție de CaCl_2 , sterilă:

$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	13 g
Apă dist.	100 ml

Se sterilizează la 120°C, timp de 20 de minute.

- Mediu universal OMS (pentru păstrarea tulpinilor lizosensibile de tulpina de *E.coli* Bruxelles și *Vibrio cholerae* grup 0:1) compus din:

Bacto-peptonă	10 g
Extract de carne	3 g
NaCl	5 g
Agar	4 g
Apă dist.	1000 ml

pH=7,2-7,4. Se sterilizează la 120°C, timp de 20 de minute, fiind repartizat în eprubete de 12x120 mm în coloană dreaptă pe înălțimea de 3-4 cm.

Tehnica de lucru

Din proba bine omogenizată, se toarnă 100 ml într-un flacon peste care se adaugă 1 ml soluție de clorură de Ca și se aduce la temperatura de 48°C într-o baie de apă. Se adaugă apoi 5 ml cultură de 18 ore de tulpina de *E.coli* Bruxelles și amestecul se ține la 48°C, timp de 3 minute, după care se toarnă peste 100 ml mediu agar pentru colifagi, topit și adus la 48°C. Întreg amestecul de agar, probă și cultură lizosensibilă se agită pentru omogenizare, cu atenție pentru a nu forma bule de aer și se repartizează în volume egale și în strat subțire în 20 cutii Petri. Se lasă să se solidifice conținutul cutiilor cu capacul întredeschis, iar după ce s-a uscat bine agarul, cutiile se incubează cu capacul în jos la temperatura de 37°C, timp de 8 ore. Pe fondul uniform de cultură după incubare, apar plajele transparente de liză bacteriofagică.

Stabilirea numărului de unități formatoare de plaje. Plajele se numără cu ochiul liber sau cu lupa și rezultatele se exprimă prin numărul de unități formatoare de plaje (UFP) în 100 ml.

17.2.6. Determinarea prezenței bacteriilor din genul *Salmonella*

Principiul metodei. Decelarea bacteriilor din genul *Salmonella* se face prin concentrarea lor din volume mari de probă prin metoda filtrării prin pernițe de tifon, urmată de etapele de: îmbogățire, dispersie și izolare pe medii selective și confirmare biochimică și serologică.

Materiale și medii de cultură

- Borcane de sticlă de 100 ml tip farmaceutic cu gura largă și dop slefuit, sterile
- Cilindri gradați de 300 ml, sterili
- Eprubete de 12x120 mm sterile
- Eprubete de 16x160 mm, sterile
- Găleată de 20 dm³ (=10 l)
- Pernițe de tifon sterile, confecționate conform modelului deja descris
- Pâlnie metalică sterilă

- Pense sterile
- Cutii Petri cu ϕ 10 cm, sterile
- Pungi de plastic neutilizate (sterile)
- Mediu geloză nutritivă
- Mediu bulion selenit de Na (de îmbogățire):

Soluția I

Hidrogenoselenit de Na (NaHSeO_3)	4 g
Apă dist.	200 ml

Soluția II

Lactoză	4 g
Petonă	5 g
Hidrogenofosfat de Na	12,6 g
Dihidrogenofosfat de Na	5,4 g
Apă dist.	800 ml

Toate componentele soluției I se fierb la 100°C , 30 de minute.

Toate componentele soluției II se dizolvă la cald, se filtrează prin hârtie de filtru, se corectează pH la 7-7,2 și se repartizează în mod steril în flacoane de 100 ml (1 dm^3). În momentul întrebuintării se amestecă soluția I cu soluția II și se repartizează în mod steril în flacoane de 100 ml.

- Mediu agar-dezoxicolat-citrat-lactoză (mediu ADCL)

a. Geloză nutritivă de bază, alcătuită din:

- Agar	20 g,
- extract de carne	5 g,
- peptonă	5 g,
- lactoză	10 g,
- roșu neutru soluție de 2%	1,3 ml,
- apă dist. 1000 ml.	

Se dizolvă componentele în apă la cald. Se corectează pH la 7,4. Se adaugă 1,3 ml roșu neutru soluție 2%. Se repartizează în baloane, se sterilizează 20 de minute la 115°C . Se păstrează la frigider.

b. Soluția A compusă din:

- Citrat de sodiu dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	17 g
- tiosulfat pentahidrat de Na ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	17 g,
- citrat de fier	2 g,
- apă dist.	100 ml.

Se sterilizează timp de 1 h la 60°C . Se păstrează la temperatura camerei.

c. Soluția B compusă din:

- Dezoxicolat de Na	10 g,
- Apă dist.	100 ml.

Se sterilizează timp de 1 oră la 60°C . Se păstrează la temperatura camerei. În momentul folosirii se topește geloză nutritivă de bază și se

adaugă pentru 100 ml geloză nutritivă de bază 5 ml soluție A și 2,5 ml soluția B, folosind pipete separate. Se omogenizează și se toarnă în cutii Petri.

Mediu Wilson Blair compus din:

Geloză pH 7,4-7,6	1000 ml
Sulfat de fier (II) sol.8%	10 ml
Verde brilliant sol.0,5%	10 ml
Amestec de bază	200 ml

Amestecul de bază se prepară astfel:

a. se dizolvă într-un balon steril, la rece, 15 g citrat de bismut amoniacal în 125 ml apă sterilă. Se adaugă 5 ml soluție 10% de NaOH. Dacă dizolvarea nu se produce se adaugă 1 sau 2 picături amoniac soluție $d=0,91$, dacă nu se dizolvă nici după adăugarea amoniacului, substanța nu poate fi utilizată.

b. Se dizolvă într-un balon steril, la cald, 50 g sulfat de Na în 175 ml apă sterilă.

c. Se dizolvă într-un balon steril, la rece 62,5 hidrogenfosfat de Na în 75 ml. apă sterilă.

d. Se dizolvă într-un balon steril, la rece, 50 g glucoză în 125 ml apă sterilă.

Se amestecă soluțiile obținute mai sus în ordinea a+b+c+d, obținându-se amestecul de bază, care se agită și se păstrează la întuneric, la temperatura camerei. Amestecul de bază se utilizează atâta timp cât își păstrează aspectul alb lăptos.

- Prepararea soluției de sulfat de fier (II): se dizolvă într-un balon steril, la rece, 8 g sulfat de fier (II) în 100 ml apă sterilă. Soluția capătă un depozit. Nu se agită și se folosește din lichidul clar, supernatant.

- Prepararea soluției de verde brilliant: se dizolvă într-un balon steril la rece, 0,5 g verde brilliant în 100 ml apă sterilă. Se poate păstra maximum două luni. Mediul Wilson-Blair se prepară astfel: se topește geloză, la baie de apă rece, se răcește aproape la 60°C și se adaugă: soluția de sulfat de Fe, soluția de verde brilliant și în final amestecul de bază care se agită înainte de a se adăuga. Se agită toate ingredientele și se toarnă în cutii Petri în ziua întrebuintării.

- Mediu TSI compus din:

Extract de carne	3 g
Extract de drojdie	3 g
Bacto-petonă	15 g
Proteoză-peptonă	5 g
Lactoză	10 g

Zaharoză	10 g
Glucoză	1 g
Sulfat feros	0,2 g
Clorură de Na	5 g
Tiosulfat de Na	0,3 g
Bacto-agar	15 g
Roșu fenol sol.1%	2,4 ml
Apă dist.	1000 ml

Prepararea se realizează astfel:

Soluția a: se dizolvă la cald toate componentele (în afară de zaharuri și de indicator), în 950 ml apă. După dizolvare se corectează pH la 7,6. Se sterilizează la 120°C, timp de 30 de minute. Se filtrează la cald și se readuce la 950 ml cu apă.

Soluția b: lactoza, zaharoza și glucoza se dizolvă în 50 ml apă sterilă și apoi soluția se sterilizează la 100°C, timp de 30 de minute (în baia de apă adusă la fierbere).

Soluția c: roșu de fenol 1 g, NaOH soluție 0,1% 10 ml, apă distilată 90 ml. Se amestecă soluțiile A+B+C, se repartizează în eprubete de 12x120 mm și se sterilizează la 105°C, timp de 30 de minute. Apoi tuburile se înclină parțial, păstrând la fund o porțiune de mediu de 1 sau 2 ml. Mediul se păstrează la 4°C, maximum 30 de zile în eprubete și 3 luni în baloane.

- Mediu MIU (mobilitate-indol-uree) compus din:

Proteoză-peptonă	30 g
Dihidrogenfosfat de K (KH_2PO_4)	2 g
Clorură de Na	5 g
Agar	3,5 g
Roșu fenol	0,008 g
Uree soluție 20%	100 ml
Apă dist.	1000 ml

Se dizolvă componentele (în afară de uree) la cald în apă, se corectează pH la 6,7 sau 6,8, se filtrează prin vată și se adaugă roșu fenol. Se repartizează câte 200 ml în flacoane de 250 ml și se sterilizează la 110°C, timp de 30 de minute. În momentul folosirii se adaugă în mod steril câte 10 ml soluție uree la fiecare 100 ml mediu topit și răcit la 45-50°C. Se repartizează în eprubete de 12x120 mm câte 5 ml și se lasă în poziție verticală pentru solidificare.

Trusă cu seruri aglutinante, antisalmonella.

Tehnica de lucru

Recoltarea probei se face ca în cazul decelării bacteriilor patogene.

Etapa de îmbogățire. Cu ajutorul unei pense sterile pernița din punga de plastic este introdusă într-un borcan de sticlă steril de 1000 ml.

Peste perniță se toarnă, cu ajutorul unui cilindru gradat de 300 ml mediu bulion selenit de Na. Cu ajutorul unei baghete de sticlă sterilă se agită bine pernița prin care s-a filtrat proba cu mediul bulion selenit de Na. Se incubează în termostată la temperatura de 37°C, timp de 72 de ore, făcând subculturi la interval de 24 ore.

Etapa de dispersie și izolare. După fiecare interval de 24 de ore de incubare la 37°C (24, 48 și 72) se fac subculturi din mediul bulion selenit de Na pe câte două cutii Petri cu mediul ADCL și câte două cutii Petri cu mediu Wilson Blair. Se incubează în termostată la 37°C timp de 24 ore cu mediul ADCL și 48 ore cu mediu Wilson Blair. În continuare se fac subculturi cu ansa bacteriologică pe geloză nutritivă înclinată, pornind de la colonii caracteristice bacteriilor din genul *Salmonella* și se incubează la 37°C, timp de 24 de ore. Pe mediul ADCL, după incubare la 37°C timp de 24 ore, apar colonii roz transparente sau semitransparente, uneori cu centrul întunecat. Pe mediul Wilson Blair după incubare la 37°C timp de 24 ore apar colonii negre cu diametrul de 1-2 mm, turtite, aderente la mediu, cu luciu și halou metalic sau mai rar colonii mici de culoare verde-albăstrui.

Etapa de confirmare biochimică. Pentru confirmarea biochimică se însămânțează mediile TSI, MIU și MILF cu culturi pure de *Salmonella* de pe geloză nutritivă înclinată. Pe mediul TSI însămânțarea se face prin înțepare cu ansa dreaptă, în profunzimea coloanei drepte a mediului, continuând în striuri dese descărcarea ansei pe panta mediului. După incubare 24 de ore la 37°C se citesc rezultatele.

Mediul TSI neînsămânțat are o culoare roz-portocaliu. Pe acest mediu sunt evidențiate următoarele proprietăți: desfacerea de tip fermentativ a glucozei (se îngălbenește coloana), producerea de gaze cu apariția de bule în coloană, elaborarea de hidrogen sulfurat înnegrirea coloanei. Partea înclinată a mediului rămâne la culoarea inițială în cazul salmonelelor, deoarece nu fermentează lactoza și zaharoza. Pe mediul MIU însămânțarea se face tot prin înțepare cu ansa dreaptă în profunzimea mediului. Pe lângă dopul de vată, se introduce și o bandă de hârtie de filtru pentru evidențierea indolului. După incubare 24 de ore la 37°C, obținem următoarele informații: coloana de mediu este opalescentă, datorită mobilității salmonelelor și nu virează culoarea mediului din roz inițial în roșu, datorită faptului că salmonelele nu produc urează. Pe hârtie de filtru pentru evidențierea indolului nu apare culoarea roșu-violacee, deoarece salmonelele nu produc indol.

Pe mediul MILF însămânțarea se face ca și pe mediul MIU. După incubare la 37°C, timp de 24 ore obținem următoarele informații: mobilitate, indol, reacția lizinei și a fenilalaninei. Prin faptul că mediul nu-și modifică culoarea din mov, cum este inițial, în galben, arată că salmonelele sunt capabile să decarboxileze lizina (elimină gruparea acidă). Rămân

astfel grupările bazice (care alcalinizează mediul) și astfel culoarea lui nu virează în galben. Salmonellele nu produc fenil-alanindezaminază. Punând câteva picături de clorură de fier (III) culoarea mediului nu virează în verde.

Etapa de confirmare serologică. Identificarea serologică pe lamă, se practică folosind schema de structură antigenică a salmonellelor, Kauffmann-White, trusa de seruri diluate antisalmonella conform indicațiilor producătorilor, notate pe eticheta fiolei și culturi tinere de 18-20 ore de pe TSI sau geloză nutritivă.

Se lucrează numai cu colonii "S" care nu aglutinează spontan în serul fiziologic. Pentru aceasta se face martorul tulpinii cu care se lucrează: pe o lamă se depune cu ansa o picătură de ser fiziologic steril, apoi tot cu ansa bacteriologică se încarcă bucla din cultura pură și se emulsionează în picătura de ser fiziologic până se obține o opacitate lăptoasă. Dacă tulpina aglutinează cu serul fiziologic este prezentă cultura "R" și nu se lucrează cu ea în continuare. Dacă tulpina nu aglutinează cu serul fiziologic este prezentă cultura "S" și se lucrează în continuare. Atunci când tulpina de *Salmonella* izolată este *raufizată*, se recultivă, în bulion prin câteva treceri succesive, apoi se dispersează pe o placă de agar nutritiv, alegând o colonie "S" din care se reface cultura pură. Pornind de la cultura "S", se trece în continuare la identificarea serologică pe lamă folosind schema următoare de lucru:

a. Situarea tulpinii izolate în genul *Salmonella*, prin aglutinări cu ser polivalent "O" antisalmonella;

b. Cercetarea prezenței antigenului "Vi", prin aglutinarea cu ser anti-"Vi". Inaglutinabilitatea sau aglutinabilitatea slabă a unor tulpini prin ser polivalent "O" antisalmonella se datorează variației cantitative a acestui antigen, care atunci când se găsește în forma "V" face ca tulpina să fie "O" inaglutinabilă;

c. Situarea tulpinii recunoscută ca *Salmonella* într-unul din grupurile "O" ale schemei de diagnostic, prin aglutinări cu serurile de grup "O" (AO, BO, CO, DO, EO etc.);

d. Cercetarea fracțiunilor antigenului "H" de fază specifică și nespecifică, prin aglutinări cu serurile anti "H" și interpretarea rezultatelor după schema Kauffmann-White.

Interpretarea rezultatelor. Tulpinile care au dat reacții biochimice tipice pentru genul *Salmonella* și au dat reacții serologice pozitive pe lamă, sunt considerate a fi tulpini ale g. *Salmonella*.

Tulpinile care au dat reacții biochimice tipice, dar nu au răspuns pozitiv la reacțiile serologice, sunt considerate a fi tulpini ale g. *Salmonella*.

Tulpinile care nu au dat reacții biochimice tipice dar au dat reacții serologice pozitive, de asemenea sunt considerate a fi tulpini ale g. *Salmonella*.

Tulpinile care au dat reacții biochimice tipice, dar nu au răspuns pozitiv la reacțiile serologice, nu sunt considerate a fi tulpini de *Salmonella*.

Pentru analiza bacteriologică a apei, este suficientă identificarea g. *Salmonella*, eventual și a grupului antigenic "O" din care face parte.

17.2.7. Determinarea prezenței speciei *Vibrio cholerae* grup 0:1

Principiul metodei. Decelarea speciei *Vibrio cholerae* grup 0:1 se face din volume mari de apă (100 ml sau prin concentrare din 10 litri), urmată de etapele: îmbogățire în medii de îmbogățire, izolate pe medii selective, confirmare biochimică și serologică.

Materiale și medii de cultură

- Materiale și sticlărie conform punctului de la g. *Salmonella*
- Tamponane Moore
- Benzi pentru reacția oxidazei
- Mediu apă peptonată alcalină de 10 ori concentrată
- Mediu apă peptonată alcalină
- Mediu agar săruri biliare (=mediu Mac Conkey)
- Mediu geloză nutritivă v. pag. 222
- Mediu TSI, v. pag. 244
- Mediu universal OMS, v. pag. 238
- Ser antiholeric grup 0:1
- NaOH soluție 10%

Tehnica de lucru

Recoltarea, însămânțarea și îmbogățirea

Recoltarea din apele de suprafață și reziduale, direct din 100 ml sau prin concentrarea prin filtrarea a 10 litri apă prin pernă de tifon sau utilizând tamponul Moore (mai ales la apele reziduale; tamponul Moore se introduce în apă timp de minimum 24 de ore, după care se ridică, se lasă să se scurgă surplusul de apă și se introduce într-un borcan pentru însămânțare).

Însămânțarea probelor se efectuează imediat la locul de recoltare. În cazul în care proba se recoltează din volume mici de apă, aceasta se însămânțează într-un borcan ce conține 100 ml apă peptonată alcalină de 10 ori concentrată.

În cazul în care se folosesc pernă de tifon sau tamponul Moore, acestea se introduc într-un borcan de 100 ml ce conține 100 ml apă peptonată alcalină de 10 ori concentrată și se completează cu apă de analizat până la nivelul gâtului borcanului.

În toate cele 3 cazuri, imediat după recoltare și însămânțare se închide borcanul ermetic cu dopul șlefuit, se omogenizează prin câteva înclinări după care cu ajutorul benzilor de hârtie indicatoare de pH se verifică pH și se corectează până la 9,2-9,4 cu soluția de NaOH (se notează ora recoltării).

Probele se transportă urgent la laborator, la temperatura ambiantă fără a folosi agenți frigorifici, apreciindu-se în funcție de ora recoltării, de durata transportului și de temperatura exterioară, durata incubării în continuare la temperatura de 37°C.

După prima îmbogățire a probelor la 37°C, timp de 6 ore, este obligatorie a doua îmbogățire. Se însămânțează din vâl sau de la suprafața mediului însămânțat un inocul de 1 sau 2 ml în eprubete care conțin câte 10-12 ml apă peptonată alcalină sterilă. Eprubetele se inoculează la temperatura de 37°C timp de 6 ore. La fel se efectuează și o a treia îmbogățire.

Etapă de izolare. Din prima, a doua sau când se efectuează și din a 3-a îmbogățire se fac treceri din vâl sau de la suprafața flaconului sau eprubetelor pe mediu agar săruri biliare, cu ansa, prin procedeul dispersiei pentru a obține colonii izolate. Cutiile Petri se incubează la 37°C timp de 24 ore, după care se face citirea notându-se coloniile suspecte: colonii transparente, clare, rotunde, cu margini netede cu un diametru de 1-2 mm, cu o suprafață netedă și ușor bombată care se deosebesc net de coloniile dense, translucide sau opace ale altor specii de bacterii din apă

Etapă de identificare. Din câteva colonii suspecte dezvoltate pe mediul agar săruri biliare se ridică pe rând cu vârful ansei cantitatea minimă necesară executării testului oxidazei folosind benzi pentru reacția oxidazei umectate cu apă distilată care se colorează în violaceu la contactul cu cultura, în caz de reacție pozitivă.

Din coloniile suspecte oxidazopozitive se însămânțează câte un tub cu geloză nutritivă înclinată (sau un sector pe o cutie Petri cu geloză nutritivă) și câte un tub cu mediu TSI pentru urmărirea fermentării zaharurilor (glucoză și lactoză) ce se vor incuba la 37°C, timp de 18 ore.

De asemenea din coloniile suspecte oxidazopozitive, se execută aglutinarea pe lamă cu serul antiholeric de grup 0:1. Se urmărește aglutinarea 3-4 min, cu ochiul liber și cu lupa, iar în caz de rezultat negativ se va face aglutinarea din masa coloniilor confluențe. Un rezultat negativ al aglutinării infirmă prezența vibriunii holerice de grup 0:1.

La 18 ore se citesc rezultatele însămânțărilor pe mediul TSI, efectuându-se triajul tuburilor, în sensul reținerii în studiu numai a celor ce prezintă reacții tipice: fermentarea fără gaz a glucozei, fermentarea sau nefermentarea lactozei, de regulă absența fermentării lactozei în 24 ore (în general fermentarea lactozei are loc tardiv în 2-3 zile), absența producerii de H₂S, iar din cultura corespondentă dezvoltată pe geloză nutritivă (tub sau sector de placă) se repetă reacția oxidazei (folosind o tulpină martor oxidazopozitivă, de exemplu o tulpină de *Pseudomonas aeruginosa*) și aglutinarea pe lamă cu serul antiholeric de grup 0:1, efectuând însă obligatoriu și un martor cu ser fiziologic conform punctului de la pag. 247.

Observație. Tulpinile ce prezintă reacții caracteristice: fermentarea fără gaz a glucozei, absența fermentării lactozei în 24 de ore, absența producerii de H_2S , reacțiile oxidazei pozitivă și aglutinarea cu ser antiholeric de grup 0:1 pozitive se păstrează pe mediul universal OMS. Identificarea tulpinii de *Vibrio cholerae* grup 0:1, este considerată ca prezumtivă; ea putându-se confirma pe baza instrucțiunilor Ministerului Sănătății.

18. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A AERULUI (DETERMINAREA AEROFLOREI)

Cunoașterea microflorei aerului constituie un indicator prețios pentru aprecierea gradului de poluare a aerului. Microflora aerului este mai puțin studiată decât cea a apei, de aceea în legătură cu noțiunea de "grad de poluare a aerului" nu există un indice, cum este de exemplu titrul coli pentru apă.

Aeromicroflora încăperilor poate servi și ca indicator al condițiilor igienice. În acest caz se poate determina fie numărul global al germenilor, fie anumite specii considerate drept indicator al gradului de poluare (streptococul hemolitic, streptococul viridans, stafilococul etc.).

18.1. Metode de determinare

Determinarea aeroflorei microbiene din încăperile închise pune problema alegerii metodei, a mediului de cultură și a momentului de determinare corespunzător scopului urmărit.

Recoltarea germenilor se poate face prin metode diferite, care sunt grupate în două categorii: 1. metode de sedimentare și 2. metode aspirative.

18.1.1. Metode de sedimentare

18.1.1.1. Metoda Koch

Această metodă constă în expunerea la aer a unor cutii Petri care conțin mediu nutritiv. Numărul cutiilor expuse (între 7-12) variază în funcție de dimensiunile încăperii. Cutiile Petri se așează la distanță de circa 1-1,5 m de pereți, menținând o distanță de aproximativ 2 m între cutii, în așa fel ca toată suprafața încăperii să fie împânzită cu acestea conform următoarei scheme:

1	2	3	4
5	6	7	
8	9	10	11

Înălțimea de la podea, la care se așează cutiile, diferă după scopul urmărit. Dacă se urmărește evidențierea microflorei eliminate din căile respiratorii cutiile Petri vor fi așezate la 0,8-1 m înălțime. Când se urmărește depistarea curățeniei generale cutiile se așează mai aproape de podea, la 0,1-0,3 m înălțime.

După turnarea mediului în cutiile Petri și solidificarea acestuia, cutiile se deschid, iar capacele se așează cu gura în jos pe o hârtie curată sterilă. Cutiile se țin astfel descoperite timp de 5-10 minute, în funcție de gradul de poluare a aerului.

Deschiderea și închiderea cutiilor se vor face în așa fel ca marginile libere ale cutiei și ale capacului propriu-zis să nu se atingă. Personalul care lucrează va trebui să poarte mască de tifon și halat curat. În timpul determinărilor, geamurile și ușile vor fi închise în permanență, iar mișcările sunt interzise. Se pot folosi mai multe tipuri de mediu: geloză simplă (pentru determinarea cantitativă a microflorei aeriene), geloză-sânge (pentru streptococul hemolitic sau streptococul viridans), mediul Löffler (pentru bacilul difteric).

Cutiile Petri trebuie să fie de aceeași mărime. Înainte de determinări se verifică sterilitatea mediilor nutritive.

După ce cutiile Petri au fost expuse la aer, acestea se pun la incubat, la 37°C pentru 48 de ore. Se face numărarea coloniilor. Numărul total de germeni găsiți pe totalul cutiilor se adună și se împarte la totalul cutiilor folosite, obținându-se media germeilor pe o cutie.

Avantajul acestei metode constă în simplitatea ei și în faptul că nu necesită nici o aparatură. Dezavantajul ei rezidă în faptul că, din conglomeratele de microorganisme care se depun, uneori se formează numai o singură colonie, la numărare obținându-se mai puțini germeni decât prin alte procedee. Apoi nu se cunoaște volumul de aer din care se face sedimentarea. Acest din urmă inconvenient poate fi înlăturat, în parte, dacă la calculare se aplică metoda lui Omelianski. Acesta deduce din calcule empirice (simple) că pe o suprafață de 100 cm² de mediu nutritiv se sedimentează în timp de 5 minute o cantitate de microorganisme egală cu numărul microorganismelor din 10 litri de aer.

18.1.2. Metode aspirative

Acestea se împart în 3 grupe: 1. metode de filtrare prin corpuri solide (nisip, sulfat de Na), 2. metode de filtrare prin lichide (barbotarea aerului prin apă zaharată 1% sterilă, prin bulion de carne sau prin ser fiziologic sterile) și 3. metode de coliziune, care constau în dirijarea jetului de aer aspirat pe suprafața mediilor nutritive solide și însămânțarea microbiană directă a suprafeței mediului fără intervenție ulterioară.

18.1.2.1. Metode de filtrare prin corpuri solide

Se bazează pe proprietatea particulelor inerte de a reține germeii din aerul care trece prin ele.

18.1.2.1.1. Metoda Petri



Fig.33. Dispozitiv de filtrare a aerului prin corpuri solide

În acest caz se folosește nisip fin pentru reținerea microorganismelor din aer. Nisipul se introduce într-un tub de sticlă având lungimea de 9 cm și diametrul de 1,6 cm (fig.33). În interiorul tubului se introduc 4 site de cupru care delimitează 2 cilindri (C_1 și C_2). Sitele trebuie să aibă ochiurile foarte mici (0,05 mm). Nisipul se alege în așa fel ca să nu treacă prin sită. Numai segmentele C_1 și C_2 din cilindru se umplu cu nisip. Partea superioară a tubului se închide cu un dop de vată, iar partea inferioară cu un dop de cauciuc găurit și prevăzut cu un tub de sticlă, închis la capătul distal cu un dop de vată. Toată instalația se sterilizează în autoclav, la 120°C , timp de o oră, după care se introduce în etuvă, la 105°C până se usucă.

În timpul determinării se înlătură

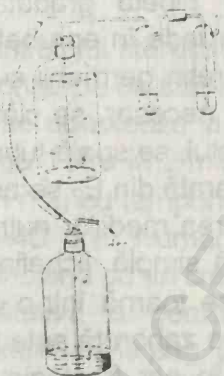


Fig.34. Dispozitiv de aspirație a aerului

dopurile de vată, iar tubul de sticlă se pune în legătură cu un sistem de aspirație (fig. 34) și se aspiră aproximativ 10 l de aer/minut. Sistemul de aspirație conține ser fiziologic steril. Aspirația aerului se bazează pe scurgerea serului fiziologic din sticla superioară în cea inferioară. După ridicarea probei, nisipul din cele două segmente C_1 și C_2 se amestecă câte 1 g cu 20 ml de geloză simplă lichefiată și răcită la 48°C . Apoi se toarnă în cutii Petri. După solidificare, cutiile Petri se pun la incubat, la 37°C , pentru 48-72 ore.

După incubare se numără coloniile apărute atât pe suprafața mediului cât și în profunzimea lui. Se recomandă să se lucreze cu cel puțin 3 probe paralele. De asemenea, se pot face însămânțări cu nisip provenit din ambele segmente C_1 și C_2 . Cunoscând numărul de colonii crescute din filtrarea a 10 l de aer, se poate calcula

numărul de colonii pentru 1 m³ de aer. Așa de exemplu, dacă din 10 l de aer au crescut în medie 50 de colonii, atunci 1m³ de aer va conține 5000 de germeni.

18.1.2.2. Metode de filtrare prin lichide

Se bazează pe barbotarea aerului prin lichide care rețin microorganismele.

18.1.2.2.1. Metoda Laveran

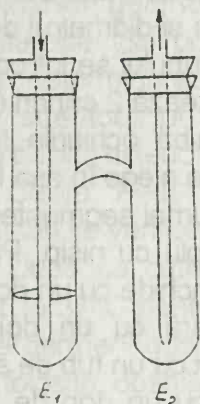


Fig.35. Barbotorul Laveran

Metoda se bazează pe folosirea barbotorului Laveran (fig 35). Acesta este alcătuit din 2 eprubete lungi, E₁ și E₂, unite în partea superioară printr-un tub orizontal mai subțire (T). Ambele eprubete sunt închise prin câte un dop de cauciuc, prin care trece câte o pipetă care ajunge aproape de fundul eprubetelor. Prima eprubetă (E₁) este marcată la 10 ml, iar pipeta din (E₂) este gradată în zecimi de mililitru. Eprubetele montate cu pipetele respective închise cu dopuri de vată, se împachetează în hârtie și se sterilizează în autoclav (120°C, timp de 30 de minute).

Înainte de ridicarea probei, se înlătură dopul de vată, apoi în eprubeta E₁ se toarnă până la semn 10 ml apă zaharată 1% sterilă, în condiții de sterilitate, iar pipeta gradată se adaptează la sistemul de aspirație. Aerul aspirat pătrunde în eprubeta E₁ prin pipetă, barbotează în apa zaharată, în care se rețin germenii și iese prin pipeta gradată. După aspirarea cantității de aer necesar, se clătește mai întâi pipeta, apoi înclinând de mai multe ori aparatul, se spală tubul de legătură și în cele din urmă și eprubeta E₂. Apa zaharată din E₂ se aspiră prin pipeta gradată și se folosește pentru însămânțarea mediilor nutritive. Doi ml din apa zaharată se adaugă la 20 ml geloză simplă, lichefiată și răcită la 48°C. Se omogenizează bine după care se toarnă într-o cutie Petri. Se execută 3 asemenea însămânțări. Dacă apa zaharată este prea bogată în germeni se pot executa diluții zecimale în ser fiziologic. Din fiecare diluție se fac câte 3 însămânțări. Cutiile Petri însămânțate se pun la incubat, la 37°C, pentru 48-72 ore. Se numără coloniile apărute atât la suprafața cât și în profunzimea mediului și se calculează numărul de germeni la 1 m³ de aer.

18.1.2.3. Metode de coliziune

18.1.2.3.1. Metoda Hesse

Se utilizează un tub de sticlă, lung de 70 cm și cu diametrul de 3,5 cm. Se închide la ambele capete cu câte un dop de cauciuc perforat prin care trece un tub de sticlă, având lungimea de 10 cm și diametrul de 1 cm. Ambele tuburi de sticlă se închid cu dopuri de vată. Tot sistemul se împachetează în hârtie și se sterilizează în autoclav (120°C , 30 de minute). Apoi se usucă în etuvă la 105°C , timp de aproximativ o oră,

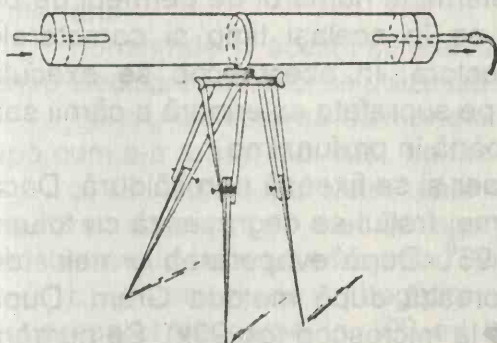


Fig.36. Dispozitiv pentru metoda Hesse

Înainte de întrebuințare, prin înlăturarea unui dop de cauciuc, se toarnă în condiții sterile circa 50 ml mediu nutritiv (geloză simplă, lichefiată și răcită la 48°C). Se închide din nou tubul, în condiții de sterilitate, cu dopul de cauciuc și se învârteste ușor tubul în jurul axei sale, până când mediul nutritiv se întinde uniform pe toată suprafața internă a tubului. După solidificarea mediului, tubul se introduce în termosta, la 37°C , pentru 24 ore în vederea

controlului sterilității. Apoi în momentul întrebuințării, tubul cu mediul este montat pe un stativ, tip trepied (fig. 36), tamponul de vată se îndepărtează și se adaptează la sistemul de aspirație. Se aspiră încet 20 l aer pe oră, circa 1 litru în 2 minute. După aspirarea aerului, capetele tubului se închid din nou cu tamponul de vată sterilă și se pune la incubat, la 37°C , pentru 24-48 ore. Numărarea coloniilor se face pe partea externă a tubului, punctând cu un creion dermatograf coloniile deja numărate. Pentru analiza calitativă a germenilor se folosesc medii nutritive corespunzătoare, specificate la pag. 252.

Pentru a controla eficiența sistemului, tamponul de vată de la capătul distal al tubului (pe unde iese aerul) nu se îndepărtează în momentul aspirației aerului decât la sfârșit, când de pe el se fac însămânțări pe mediu nutritiv solid. În acest caz la sfârșitul aspirației tubul se închide cu un alt tampon de vată sterilă. În final se calculează numărul total de germeni găsiți într-un m^3 de aer.

19. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A CĂRNII ȘI A PREPARATELOR DE CARNE

Această analiză se referă la determinarea numărului de germeni prin metoda directă (microscopică), detectarea salmonelelor, a bacteriilor coliforme, a bacteriilor din genul *Proteus*, detectarea și numărarea stafilococilor coagulazo-pozitivi și detectarea clostridiilor sulfitoreducătoare.

19.1. Determinarea numărului de germeni prin metoda directă (microscopică)

Prin această metodă se determină numărul de germeni de pe un câmp microscopic, stabilindu-se în același timp și caracterele morfologice și tinctoriale ale acestora. În acest scop se execută frotiuri prin metoda amprente, de pe suprafața exterioară a cărnii sau de pe suprafața cărnii secționată până în profunzime.

Frotiurile se usucă apoi la aer și se fixează prin căldură. Dacă produsul analizat a conținut grăsime, frotiul se degresează cu toluen și apoi se spală cu alcool etilic 96°. După evaporarea urmelor de toluen și alcool, frotiurile se colorează după metoda Gram. După colorare și uscare, se examinează la microscop (ob.90x). Se numără celulele de pe minimum 10 câmpuri microscopice și apoi se stabilește numărul de germeni pe un câmp microscopic, calculând media valorilor găsite.

19.2. Detectarea bacteriilor din genul *Salmonella*

Salmonelele se caracterizează pe planul proprietăților lor metabolice prin aceea că fermentează glucoza cu producere de gaz, nu fermentează lactoza, folosesc citratul ca unică sursă de carbon și energie, produc H_2S , nu produc indol și nici urează.

În vederea detectării salmonelelor în carnea proaspătă și refrigerată se folosesc probe de 50 g carne sau preparat de carne. Dacă aceste probe sunt congelate, se vor păstra la frigider, pentru decongelare, la aproximativ 5°C, timp de circa 12 ore.

În continuare probele de carne sau preparate de carne se taie în bucăți mici de 0,5-1 cm cu foarfeci inoxidabile sterilizate sau se trec printr-o mașină de tocat carne, sterilizată în prealabil, după care pot fi păstrate maximum o oră la 0°-5°C.

În vederea efectuării diluțiilor se cântăresc 10 g din produsul tăiat mărunt sau tocat și se adaugă 40 ml soluție pentru diluare. Soluția pentru diluare este formată din:

Soluție NaCl 0,85% 100 ml

Peptonă 0,1 g

Se sterilizează timp de 20 minute la 120°C.

Omogenizarea se face timp de 1-2 minute într-un dispozitiv electric pentru omogenizare cu 15.000-20.000 rotații/minut. În lipsa acestuia omogenizarea se face într-un mojar steril cu nisip steril sau într-un balon steril cu perle de sticlă. Maceratul obținut se lasă 15 minute la temperatura camerei pentru stimularea dezvoltării bacteriene.

Pornind de la acesta se execută diluții de ordinul 10^{-1} , 10^{-2} - 10^{-5} . Pentru efectuarea diluțiilor se utilizează soluția de diluare descrisă mai sus.

Pentru detectarea salmonelelor din proba de carne pregătită după cum s-a arătat mai sus, se fac însămânțări în felul următor:

a) în striuri paralele, câte 25 g produs, pe două medii selective, care pot fi mediile agar-verde brillant și Gassner sau mediile Istrati-Meitert, Leifson sau Wilson-Blair;

b) în striuri de îmbogățire, câte 25 g carne sau produs semipreparat de carne în 100 ml bulion selenit-cistină sau bulion-selenit acid de Na și câte 25 g carne în 1000 ml bulion Müller-Kauffmann.

În cazul probelor care conțin grăsime se mai adaugă 6 ml soluție 10% de tergitol, după care se agită bine.

Mediile selective agar-verde brillant, Gassner și Istrati-Meitert se incubează la 37°C, timp de 24 ore, iar mediile Wilson-Blair și Leifson tot la 37°C timp de 48 ore.

Mediile de îmbogățire se incubează astfel:

- mediul Müller-Kauffmann la 37°C timp de 18-20 ore, după care se fac treceri pe medii selective;- mediul bulion selenit-cistină și bulion selenit acid de Na la 37°C, timp de 24 sau 48 ore, după care se fac treceri pe medii selective.

Se recomandă ca în plus să se facă și însămânțarea a 25 g carne în bulion selenit-cistină sau bulion selenit acid de Na și a 25 g carne în mediul Müller-Kauffmann, toate aceste medii din urmă fiind apoi incubate la 43°C. În acest mod crește eficiența examenului.

În vederea identificării tulpinilor de *Salmonella* din fiecare cutie Petri care a conținut mediu selectiv se selecționează câte 5 colonii care se însămânțează pe mediul geloză-lactoză cu albastru de bromtimol.

Pentru confirmarea biochimică a coloniilor lactozo-negative se urmăresc, prin însămânțări pe medii speciale, următoarele caractere

biochimice: fermentarea unor zaharuri (glucoză, zaharoză, manitol), producerea de H_2S , creșterea pe mediul cu citrat, producerea de indol, reacția la roșu de metil, reacția Voges-Proskauer, prezența ureazei, a lizindecarboxilazei, testul malonatului, testul fenilalaninei.

Identificarea serologică se efectuează prin reacții de aglutinare față de seruri aglutinante antisomatice și flagelare folosind:

- ser polivalent "O" *anti-Salmonella*
- seruri de grup "O"
- ser anti "Vi"
- seruri anti "H" de fază specifică
- seruri anti "H" de fază nespecifică

19.3. Detectarea bacteriilor coliforme

Din mixtura obținută din 10 g carne + 40 ml soluție pentru diluare, pregătită după cum s-a arătat mai înainte, se fac însămânțări pe mediul bulion-bilă-lactoză-verde brilliant (vezi tehnica folosită la analiza bacteriologică a apei).

19.4. Detectarea bacteriilor din genul *Proteus*

Bacteriile din genul *Proteus* se caracterizează prin următoarele proprietăți mai importante: sunt bacili Gram-negativi, mobili, nu fermentează lactoza, produc urează, formează acid fenilpiruvic din fenilalanină.

Pentru izolarea lor se fac însămânțări din macerat sau din diluția 10^{-1} pe geloză înclinată (mediu proaspăt). Însămânțarea se face în lichidul de condensare, fără a atinge suprafața mediului. Volumul însămânțat este de 1 ml. Se mai poate utiliza și mediul Leifson modificat de Hynes.

Mediile cu geloză înclinată se incubează la $37^{\circ}C$ timp de 16-24 ore. Prezența bacteriilor din genul *Proteus* este dedusă din existența fenomenului de invazie. Mediul Leifson modificat de Hynes se incubează la $37^{\circ}C$, timp de 24-48 ore. Coloniile bacteriilor din genul *Proteus* sunt mari, incolore, cu centrul negru sau portocaliu sau sunt de mărime mijlocie de culoare roz deschis.

Pentru confirmarea tulpinilor izolate se urmăresc în continuare următoarele reacții biochimice: prezența ureazei, testul fenilalaninei, producerea de H_2S , producerea de indol, creșterea pe mediu cu citrat, lichefierea gelatinei.

19.5. Detectarea și numărarea stafilococilor coagulazo-pozitivi

Stafilococii coagulazo-pozitivi se caracterizează prin aceea că formează colonii tipice pe suprafața mediilor selective de cultură și prezintă reacția coagulazei pozitive. În cazul detectării, se determină numărul de stafilococi coagulazo-pozitivi/g carne sau preparat de carne.

În acest scop, se însămânțează câte 1 ml din macerat și din primele două diluții (10^{-1} și 10^{-2}), în câte 3 eprubete conținând 10 ml mediu de îmbogățire (mediu hipersalin, formula Chapman). Se incubează la 37°C , timp de 48 ore. Se fac subculturi pe unul din mediile selective (*Mediul ETGPA* = mediul Baird-Parker A.C. = geloză cu adaos de gălbenuș de ou, telurit de K, glicerină și piruvat de sodiu; *Mediul GPT* = geloză lactoză-manitol-clorură de sodiu cu adaos de ou și de telurit de potasiu). Culturile în ale căror subculturi s-a confirmat prezența stafilococilor coagulazo-pozitivi sunt socotite pozitive. Se determină numărul probabil al stafilococilor coagulazo-pozitivi cu ajutorul tabelului lui McCrady, ținând seama de diluții.

Pentru numărarea stafilococilor coagulazo-pozitivi se fac însămânțări din macerat și din diluțiile efectuate, în cutii Petri, pe unul sau 2 medii selective (ETGPA sau GPT). Însămânțarea se face în suprafață. Volumul însămânțat este de 0,1 ml. Încubarea se face la 37°C , timp de 24 sau 48 ore, după care se numără coloniile caracteristice. Se selecționează cutiile Petri în care au crescut coloniile caracteristice. Câteva din acestea se controlează, făcându-se subculturi. Acestea se verifică prin: testul fosfatazei, examen microscopic, reacția catalazei, prezența coagulazei libere. Dacă după primele 24 ore nu s-au dezvoltat colonii caracteristice pe mediile selective, se face un nou control după 48 de ore.

Se păstrează, pentru a se proceda la numărarea coloniilor caracteristice, numai cutiile Petri în care pe mediul selectiv au crescut 10-300 asemenea colonii. Având în vedere cantitatea însămânțată și gradul de diluție se obține numărul prezumtiv de stafilococi patogeni.

Pentru a determina numărul coloniilor de stafilococi patogeni se recomandă:

- controlul a 5 colonii caracteristice, dacă pe mediul însămânțat se găsesc până la 50 colonii suspecte;
- controlul a 10 colonii caracteristice, dacă pe mediul însămânțat se află mai mult de 50 colonii suspecte.

Luând în considerație numărul de colonii confirmate de stafilococi patogeni și numărul prezumtiv, se obține numărul stafilococilor patogeni la 1 g produs.

Dăm un exemplu: la un examen prezumtiv s-au găsit 120 colonii de stafilococi. În urma verificării unui număr de 10 colonii s-a găsit că 8 erau stafilococi patogeni. Calculându-se, se constată că numărul de stafilococi patogeni din produsul examinat este de 96/g produs sau la 1 ml produs.

19.6. Detectarea clostridiilor sulfitoreducătoare

În acest caz se urmărește prezența bacililor Gram-pozitivi, sporulați, strict anaerobi, care produc H_2S pe mediul cu sulfat de Na și sulfat feros sau pe mediul DRCA.

Se efectuează un examen prezumtiv pentru determinarea prezenței sau absenței clostridiilor sulfitoreducătoare urmat de un examen de confirmare. Pentru examenul prezumtiv se însămânțează câte 1 ml din macerat și din diluțiile 10^{-1} , 10^{-2} și 10^{-3} în 20 ml mediu conținând sulfat de Na și sulfat feros (vezi mediul: geloză cu sulfat de Na, polimixină B și neomicină) sau în mediul DRCA, în câte două eprubete. Una din aceste eprubete conținând mediul însămânțat de la fiecare diluție, se încălzește într-o baie de apă la $70^{\circ}C$, timp de 10 minute, începând din momentul când lichidul din eprubetă a atins această temperatură. Pentru măsurarea precisă a temperaturii într-o eprubetă cu mediu având aceleași dimensiuni se introduce un termometru care va indica temperatura din baia de apă.

Eprubetele cu mediu însămânțate, precum și cele însămânțate și tratate termic (10 minute la $70^{\circ}C$) se pun la incubat la $37^{\circ}C$, timp de 7 zile. În acest interval se urmărește înnegrirea mediului, indice prin care se presupune prezența clostridiilor sulfitoreducătoare.

Pentru confirmarea prezenței clostridiilor sulfitoreducătoare se mai fac cultivări pe medii care permit punerea în evidență a unor caractere de aerobioză sau anaerobioză. Pentru diferențierea clostridiilor sulfitoreducătoare este necesar să se execute un examen pentru mobilitate și mai multe examene biochimice (fermentarea lactozei, reducerea nitratului, modul de creștere în lapte turnesolat 5%, activitatea proteolitică, activitatea lipoproteinlipazică).

De ex., confirmarea prezenței bacteriei *Clostridium perfringens* se face prin controlul mobilității, fermentării lactozei, a modului de creștere în lapte turnesolat și reacției Nagler.

20. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A LAPTELUI ȘI A PRODUSELOR LACTATE

Pentru analiza microbiologică a laptelui și a produselor lactate se efectuează următoarele determinări: determinarea numărului de germeni, determinarea numărului probabil de bacterii coliforme, determinarea numărului de drojdii și mucegaiuri și proba reductazei.

20.1. Recoltarea probelor pentru analiză

Materialele folosite pentru recoltarea probelor (spatule, linguri, recipiente de sticlă, cuțite, pipete etc.) trebuie să fie curate și sterilizate fie în autoclav ($120^{\circ}\text{C}/30$ minute), fie în etuvă ($170^{\circ}\text{C}/1$ oră). Numărul probelor pentru analize se iau în funcție de numărul ambalajelor sau al bucăților dintr-un lot. După recoltarea probelor, în condiții sterile, acestea se analizează după maximum 4 ore.

20.2. Determinarea numărului total de germeni

Prin această determinare se stabilește gradul de contaminare a produsului. Se aplică metoda descrisă la pag.69, cu deosebirea că în loc de geloză simplă se mai pot utiliza alte două medii nutritive: agar-bulion de carne - peptonă - lactoză sau agar-zer de lapte-peptonă. Redăm mai jos compoziția acestor două medii nutritive. Mediul agar-bulion de carne-peptonă-lactoză se compune din:

Zeamă de carne	1000 ml
Peptonă	10 g
Lactoză	10 g
NaCl	5 g
Agar-agar	20 g

pH mediului se ajustează la 7,2-7,4. Mediul se sterilizează la 110°C , timp de 30 minute.

Mediul agar-zer de lapte-peptonă are următoarea compoziție:

Zer de lapte	1000 ml
Peptonă	10 g
Agar-agar	20 g
NaCl	5 g

pH mediului se stabilește la 7,2-7,4. Mediul se sterilizează la $110^{\circ}\text{C}/30$ minute.

De asemenea, pentru efectuarea diluțiilor în afară de apă de robinet se mai poate folosi ser fiziologic sau ser fiziologic la care se adaugă în proporție de 0,1% peptonă (sterilizarea acestora făcându-se la 120°C, timp de 30 minute).

20.3. Determinarea numărului probabil al bacteriilor coliforme

Gradul de contaminare a laptelui sau a produselor lactate reflectă condițiile igienico-sanitare ale proceselor de fabricație.

Pentru determinarea numărului de germeni coliformi se poate aplica testul prezumtiv și cel de confirmare, descrise la analiza bacteriologică a apei. În industria laptelui se utilizează mai frecvent mediul Kessler-Swenarton. Acesta are următoarea compoziție:

Bilă de bou proaspătă, filtrată	50 ml
Peptonă	10 g
Lactoză	10 g
Violet de gețiană 1%	4 ml
Apă de robinet	1000 ml

Se adaugă în apă peptonă și bilă de bou. Se fierbe 30 de minute, amestecând continuu. Se sterilizează în autoclav 30 minute, la 115°C, după care se filtrează prin vată. Se adaugă apoi lactoza și se completează cu apă distilată până la volumul de 1000 ml. pH se ajustează la 7,4-7,6. Se adaugă violetul de gețiană și se filtrează. Se repartizează în eprubete (5 ml/eprubetă). Se introduc tubușoarele Durham. Se sterilizează în autoclav la 110°C, timp de 30 minute. După sterilizare, tubușoarele Durham trebuie să fie lipsite de aer.

Din probele supuse analizei se execută diluții zecimale, de la 10^{-1} - 10^{-5} . Se poate lucra și cu produsul nediluat (10^0). Din fiecare diluție se însămânțează câte 1 ml în 3 eprubete cu mediu, evitând formarea bulelor. Incubarea durează 48 ore la 37°C. Se urmărește apariția bulelor de gaze în tubușoarele Durham. În cazul în care s-au produs gaze în una sau mai multe eprubete, gazul ocupând cel puțin 1/10 din înălțimea tubului de fermentație, testul este pozitiv.

Stabilirea numărului probabil de bacterii coliforme se face prin numărarea eprubetelor pozitive la ultimele diluții în care testul este pozitiv. În acest scop se întocmește un tabel în care se trec numărul eprubetelor pozitive în cazul fiecărei diluții (vezi tabelul 27).

Tabelul 27**Stabilirea eprubetelor pozitive pentru germenii coliformi**

Numărul eprubetei	Diluția					
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	-	-	-

După cum se poate vedea din tabelul 27 ultimele 3 diluții la care a apărut reacția pozitivă sunt 10^{-2} , 10^{-3} și 10^{-4} , iar numărul eprubetelor cu reacția pozitivă este 3.2.1.

Pentru această combinație 3.2.1. se caută în tabelul 28 și se găsește cifra 15. La valoarea citită se adaugă atâtea zerouri câte diluții cu reacție pozitivă au fost neglijate. În cazul exemplului de mai sus se adaugă un zero și deci numărul probabil de bacterii coliforme la 1 ml de lapte sau 1 g de produs lactat va fi 150.

20.4. Determinarea numărului de drojdii și mucegaiuri

Numărul acestor tipuri de microorganisme indică starea condițiilor igienico-sanitare în procesul de producție și păstrare a probelor.

Pentru determinarea numărului de drojdii se va folosi mediul malț agarizat care se compune din:

Tabelul 28

Stabilirea numărului probabil de bacterii coliforme din lapte

Numărul eprub. din ultimele trei diluții la care s-a produs reacția pozitivă	Numărul probabil de bacterii coliforme	Numărul eprub. din ultimele trei diluții la care s-a produs reacția pozitivă	Numărul probabil de bacterii coliforme
0 0 0	0,0	2 2 1	3,0
0 0 1	0,3	2 2 2	3,5
0 1 0	0,3	2 2 3	4,0
0 1 1	0,6	2 3 0	3,0
0 2 0	0,6	2 3 12	3,5
1 0 0	0,4	2 3 2	4,0
1 0 1	0,7	3 0 0	2,5
1 0 2	1,1	3 0 1	4,0
1 1 0	0,7	3 0 2	6,5
1 1 1	1,1	3 1 0	4,5
1 2 1	1,5	3 1 1	7,5
1 3 0	1,6	3 1 2	11,5
2 0 0	0,9	3 1 3	16,5
2 0 1	1,4	3 2 0	9,5
2 0 2	2,0	3 2 1	15,0
2 1 0	1,5	3 2 2	20,0
2 1 1	2,0	3 2 3	30,0
2 1 2	3,0	3 3 0	25,0
2 2 0	2,0	3 3 1	45,0
		3 3 2	120,0
		3 3 3	140,0

Făină de malt

250 g

Agar-agar

30 g

Apă de robinet

1000 ml

La făina de malt se adaugă apa, după care se încălzește la 57°C și se menține la această temperatură timp de o oră. Se ridică apoi treptat temperatura până la 63°C, menținându-se la această temperatură până când dispare reacția amidonului cu iodul (nu mai apare culoarea albastră). Se filtrează prin pânză, storcându-se partea nesolubilizată. La lichidul astfel obținut se adaugă agar-agarul. Amestecul se lichefiază în autoclav, la 120°C, timp de 20 minute. Se filtrează la cald prin vată. Se repartizează în eprubete (18-20 ml/eprubetă) și se sterilizează din nou la 120°C, 20 de minute.

Pentru determinarea numărului de mucegaiuri se utilizează mediul cu cartofi-glucoză-agar care se prepară din:

Infuzie din 200 g cartofi	1000 ml
Glucoză	20 g
Agar-agar	15 g

Pentru obținerea infuziei de cartofi, se fierb 200 g cartofi tăiați în felii în 1000 ml apă distilată timp de o oră. Amestecul se filtrează prin tifon dublu, prin stoarcere. La filtratul obținut se adaugă apă distilată până la volumul inițial de 1000 ml. Apoi se introduce glucoza și se agită pentru dizolvarea acesteia. Se adaugă apoi și agar-agarul. Se lichefiază în autoclav la 110°C , timp de 20 minute. Se filtrează prin vată la cald. Se repartizează în eprubete (18-20 ml/eprubetă) și se sterilizează în autoclav la 110°C , 30 de minute.

În momentul analizei, din diluțiile preparate pentru determinarea numărului total de germeni se fac însămânțări în cutii Petri sterile. Pentru fiecare diluție se însămânțează cel puțin 3 cutii Petri, cu 1 ml.

Mediul pentru cultivarea drojdiilor se lichefiază pe baia de apă și se răcește la 48°C . Înainte de a fi turnat în cutia Petri la acesta se adaugă 0,2 ml dintr-o soluție sterilă de acid lactic 5% (sterilizarea acidului lactic se face la 110°C , timp de 30 minute). Mediul se toarnă apoi în cutia Petri. Se omogenizează cu diluția, iar după solidificare se pun la incubat. Incubarea are loc la temperatura camerei, timp de 5 zile. După incubare, se numără coloniile apărute și se face media pentru o singură cutie, în cazul fiecărei diluții.

Pentru cultivarea mucegaiurilor se procedează în mod similar ca și la procedeul descris pentru drojdii. Singura deosebire este aceea că la mediul lichefiat și răcit la 48°C se adaugă 0,1-0,5 ml soluție sterilă de acid tartric 10% (sterilizarea acidului tartric se face la fel ca și la acidul lactic). Cantitatea de acid tartric se tatonează înainte în așa fel ca după adăugarea sa mediul să aibă pH 3,5. Soluția de acid tartric se adaugă la mediu după o prealabilă încălzire la 45°C . Incubarea are loc tot la temperatura camerei, durata fiind de 5-10 zile. După incubare se stabilește numărul mediu de colonii de mucegaiuri/cutie Petri.

20.5. Proba reductazei

Prin proba reductazei se determină în mod indirect numărul de microorganisme din lapte, prin măsurarea activității lor metabolice. Numărul de microorganisme indică gradul de contaminare a laptelui.

Proba reductazei se poate efectua a). cu albastru de metilen și b) cu resazurină.

20.5.1. Proba reductazei cu albastrul de metilen

Albastrul de metilen adăugat într-o cantitate mică la proba de lapte este decolorat după un anumit timp, datorită acțiunii oxidoreducătoare a microorganismelor. Viteza de decolorare dă indicații aproximative asupra numărului de microorganisme existente în lapte.

Pentru efectuarea analizei se ia o eprubetă curată mare, având volumul de 50 ml. Se introduc 0,5 ml soluție de albastru de metilen (se folosește o soluție alcătuită din 5 ml soluție alcoolică saturată de albastru de metilen, la care se adaugă apoi 195 ml apă distilată). Apoi se adaugă 20 ml din laptele de cercetat încălzit în prealabil la 38-40°C. După amestecare, eprubeta se pune în baia de apă sau la termostat la 38°C. Decolorarea se urmărește la 3 intervale de timp: după 20 de minute, după 2 ore și după 5^{1/2} ore. Analiza poate fi considerată terminată când întreaga probă s-a decolorat.

În raport cu timpul de decolorare laptele se împarte în următoarele 4 clase, conform tabelului 29

20.5.2. Proba reductazei cu resazurină ($C_{12}H_6NNaO_4$)

Resazurina este o oxazonă, care introdusă în lapte dă o colorație albastră. Sub acțiunea microorganismelor din lapte este redusă în resorufină de culoare roșie-roz și apoi în dihidroresorufină incoloră. Pe baza aprecierii nuanței de culoare la care ajunge amestecul lapte-resazurină, după o oră de incubare la 37°C, laptele este clasificat după calitate în 4 grupe (vezi tabelul 29).

Pentru efectuarea analizei, într-o eprubetă obișnuită se introduce 1 ml resazurină, soluție apoasă 0,05% sterilă (sterilizată prin tindalizare), proaspăt preparată, peste care se pipetează 10 ml din laptele analizat. Se închide eprubeta apoi cu un dop de cauciuc steril. Se omogenizează bine amestecul și eprubeta se pune apoi pentru o oră la 37°C. După incubare, din nou se agită proba pentru uniformizare și se apreciază nuanța de culoare la care a ajuns amestecul lapte-resazurină, conform tabelului 30.

Tabelul 29

Stabilirea numărului aproximativ de germeni pe baza probei
reductazei cu albastru de metilen

Timpul de decolorare	Calitatea laptelui	Clasele	Numărul de germeni la 1 ml de lapte
Peste 5 ^{1/2} ore	Bună	I	Sub 500.000
De la 5 ^{1/2} la 2 ore	Satisfăcătoare	II	De la 500.000 la 4.10 ⁶
De la 2 ore la 20 minute	Proastă	III	4.10 ⁶ -20.10 ⁶
Sub 20 de minute	Foarte proastă	IV	Peste 20.10 ⁶

Tabelul 30

Aprecierea calității laptelui în funcție de rezultatele la proba
reductazei cu resazurină

Nuanța de culoare	Calitatea laptelui	Clasa
Albastru oțel-albăstrui-pastel	Bună	I
Violet albastru-violet roșu	Satisfăcătoare	II
Roz-roz spre alb	Proastă	III
Alb	Foarte proastă	IV

20.6. Cultivarea bacteriilor lactice

Bacteriile lactice se cultivă cel mai bine pe un mediu nutritiv alcătuit din lapte proaspăt, lapte praf sau pe mediu Plate-Count-Agar.

Laptele de vacă prezintă următoarea compoziție generală:

Apă	cca 87%
Lactoză	5%
Lipide	3,8%
Cazeină	2,5%
Albumină și globulină	0,7%
Cenușă	0,7%
pH	6,7%

Laptele de vacă conține și factori de creștere, în cantitate mică, mai ales vitamine din complexul B.

Laptele colectat după mulgere în vase curate se infectează imediat cu bacterii lactice prezente pe ugerul animalelor, pe părul acestora, în aer și uneori și în recipiente în care se colectează. Cu

alte cuvinte laptele proaspăt este deja un mediu nutritiv inoculat cu bacterii lactice.

Dacă se repartizează lapte proaspăt în eprubete sau baloane care se închid cu dopuri de vată și se pun la incubat, la 30-35°C, pentru 24 ore, bacteriile lactice se multiplică, produc acid lactic, care face ca pH să scadă de la 6,7 la cca 4,6. La această valoare de pH, cazeinatul de calciu care se găsește în laptele proaspăt în stare dizolvată, reacționează cu acidul lactic apărut în urma fermentației lactice și se formează lactat de Ca și cazeină. La acest pH cazeina precipită (fiind și punctul izoelectric al cazeinei), iar laptele coagulează.

Una din caracteristicile importante ale unei culturi de bacterii lactice este durata ei normală de coagulare. Această proprietate se va urmări la fiecare pasaj (reînsămânțare), întrucât orice modificare a duratei de coagulare constituie un defect, care trebuie eliminat.

La o cultură lactică, examenul organoleptic este de mare importanță. Se apreciază în acest scop mirosul culturii, aspectul, consistența și în cazuri industriale și gustul. Astfel, la aprecierea aspectului se urmărește dacă coagulul este compact, dacă prezintă crăpături, bule de gaz, coagul spongios, coagul contractat sau eliminare de zer. La aprecierea consistenței se va urmări cremozitatea sau tendința spre filanță a coagulului, respectiv finetea. De obicei gustul și mirosul culturii se examinează după ce în prealabil s-a îndepărtat în mod steril stratul oxidat de la suprafață. Se va urmări prezența gustului și a aromei specifice tipului de cultură bacteriană lactică, respectiv absența sau prezența vreunui miros sau gust străin.

În lapte pot ajunge, încă după mulgere, în cursul transportului și alte microorganisme. În general bacteriile de putrefacție nu se multiplică deoarece pH acid creat de bacteriile lactice este nefavorabil acestor bacterii. Pe suprafața laptelui acru mai vechi se dezvoltă mucegaiul de lapte (*Oidium lactis*) care utilizează drept sursă de carbon și energie acidul lactic produs de bacteriile lactice.

Laptele poate conține și microorganisme patogene sau virusuri zoopatogene, care ajung în acesta de la animalul bolnav, din mediu sau de la personalul implicat în mulgere și manipularea laptelui. Bacteriile coliforme constituie un indicator sanitar al calității laptelui. Laptele de calitate bună conține un număr foarte mic de germeni coliformi (sub 100 bacterii coliforme/ml) sau este lipsit de germeni coliformi.

20.7. Stabilirea numărului de bacterii lactice prin metoda numărătorii directe după Breed

Principiul metodei. Din laptele proaspăt sau din cultura lactică se execută frotiuri, care se colorează, apoi se examinează la microscop, stabilindu-se numărul de bacterii/ml pe baza unei formule matematice.

Aparatură, coloranți, materiale

- microscop
- micropipetă
- micrometru obiectiv
- lame de microscopie
- șablon de hârtie cu latura de 1 cm a pătratului
- suport de cupru pentru uscarea lamelor
- ansă cu ac metalic având vârful îndoit în unghi drept
- soluție de albastru de metilen Löffler
- xilen
- lapte proaspăt, culturi de bacterii lactice

Tehnica de lucru

Se așează pe platina microscopului micrometrul obiectiv, se adaugă o picătură de ulei de imersie, apoi utilizând un ocular de 10 X se modifică înălțimea tubului microscopului până când câmpul vizual are un diametru de 0,205 mm. În felul acesta se obține o suprafață de $1/3000 \text{ cm}^2$ sau la un diametru de 0,146 mm se va obține o suprafață de $1/6000 \text{ cm}^2$.

Din proba de lapte sau din cultura bacteriană lactică se recoltează cu micropipeta un volum mai mare, după care se stabilește volumul de 0,01 ml, cu ajutorul unui tampon de vată sterilă.

Pe o lamă de microscopie curată și degresată se suflă conținutul micropipetei într-unul din pătratele șablonului aflat sub lamă. Cu ajutorul acului metalic în forma literei "L" se întinde în mod uniform laptele sau cultura pe suprafața de 1 cm^2 . Se usucă preparatul pe suportul de cupru.

Apoi se fixează la flacără. În continuare preparatele se degresează cu xilen, ținut pe lamă timp de 1 minut. Se usucă lamele apoi pentru evaporarea urmelor de xilen. Se colorează cu albastru de metilen Löffler, timp de 1 minut. Se spală, se usucă și se examinează la microscop cu obiectivul de imersie. Se numără bacteriile în cel puțin 10 câmpuri și se calculează valoarea medie pe un câmp. Apoi se calculează numărul de bacterii la 1 ml în felul următor: numărul de

bacterii găsite pe un câmp microscopic se înmulțește cu 100 (provin din 0,01 ml) și cu numărul de câmpuri dintr-un cm^2 .

$$N_t = N_c \times 100 \times S$$

unde

N_t = numărul total de bacterii per mililitru

N_c = numărul de bacterii găsite pe un câmp microscopic

S = numărul de câmpuri microscopice dintr-un cm^2

Când se face numărătoarea bacteriilor se va ține seama de bacteriile izolate și de grămezile de bacterii care se numără separat.

Metoda permite diferențierea pe lamă a bacteriilor vii de cele moarte, dacă după colorarea cu albastru de metilen Löffler pe lamă se toarnă o soluție de fucsină fenicată 10%. Bacteriile vii sunt colorate în albastru (rămân colorate în albastru, nepierzând primul colorant), pe când bacteriile moarte pierd culoarea albastră și se colorează în roșu. Variația ciamofiliei bacteriilor este în funcție de vitalitatea acestora.

La culturile bacteriene lactice, unde numărul de bacterii este foarte ridicat (de ordinul miliardelor) este necesar să se prepare diluții de lapte de 1/10, 1/100, 1/1000 (adică 1ml lapte la 10, 100, 1000 ml ser fiziologic steril). La calculul final al numărului de bacterii se va ține seama de diluția pe care s-a făcut examinarea.

20.8. Examinarea chimică a zerului

Din zer se pune în evidență acidul lactic produs de bacteriile lactice. Se lucrează cu zerul filtrat prin hârtie de filtru. Se compară rezultatele cu cele obținute la acid lactic p.a.

20.8.1. Evidențierea acidului lactic din zer cu ajutorul reacției fenolice

Această reacție nu este specifică numai pentru acidul lactic, ci și pentru alți hidroxiacizi, ca acidul malic, acidul tartric.

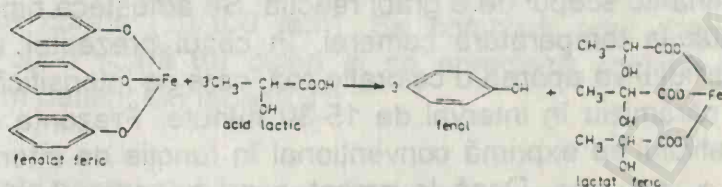
Material necesar

- Zer
- Soluție de acid lactic
- Soluție de fenol 5%
- Soluție de FeCl_3 5%

Tehnica de lucru

Într-o eprubetă se pipetează 1 ml soluție de fenol 5%, după care se introduc 2 ml soluție de FeCl_3 5%. Se formează fenolat feric de culoare albastru ametist. La soluția albastră se adaugă zer sau o soluție diluată de acid lactic. Culoarea dispare, lichidul devenind

incolor, mai precis de culoare galben pai, datorită formării lactatului feric, conform formulei de mai jos:



20.8.2. Evidențierea acidului lactic din zer, cu ajutorul reacției aldehydice

Principiul metodei. Permanganatul de K oxidează acidul lactic din zer în aldehydă acetică, aceasta reducând azotatul de Ag amoniacal.

Material necesar

- KMnO_4 soluție 2%
- H_2SO_4 soluție 10%
- Zer
- Soluții diluate de acid lactic
- Azotat de Ag amoniacal

Tehnica de lucru

Într-o eprubetă se introduc 10 ml zer sau soluție diluată de acid lactic. Apoi se adaugă 1 ml H_2SO_4 10%. Amestecul se încălzește cu precauție până la fierbere. Apoi se adaugă picătură cu picătură KMnO_4 sol. 2%. Se formează aldehydă acetică. Prezența ei se evidențiază prin reducerea AgNO_3 amoniacal la Ag metallic. În acest scop la gura eprubetei se adaugă o bandă de hârtie de filtru umezită cu soluție de azotat de Ag amoniacal. Continuând încălzirea eprubetei, dacă s-a format aldehydă acetică, aceasta va duce la apariția argintului metallic (o pată de culoare neagră sau brună apare pe hârtie).

20.9 Determinarea calitativă a diacetilului și acetoinei în culturile aromatizante

Principiul metodei. Produsul lactat trebuie să prezinte un gust și o aromă specifică, datorate în cea mai mare parte cantității de diacetil produse de bacteriile lactice.

Reactivi și materiale

- KOH soluție 30%.
- Creatină pulbere
- Culturi de bacterii lactice

Tehnica de lucru

În capsule de porțelan sau sticlă se introduce 1 ml de KOH 30%. Apoi se adaugă 1 ml cultură de analizat și câteva cristale de creatină cu scopul de a grăbi reacția. Se amestecă bine și se lasă în repaus la temperatura camerei. În cazul prezenței acetoiniei și a diacetilului va apărea o colorație roz, care se intensifică până la roșu sau cărămiziu în interval de 15-30 minute. Prezența acetoiniei și a diacetilului se exprimă convențional în funcție de intensitatea culorii prin +, ++, +++. Dacă la amestec nu se adaugă creatină, citirea rezultatelor se va face după 1-2 ore.

20.10. Tehnica dozării diacetilului din culturi prin metoda microdifuziei

Principiul metodei. Dozarea se bazează pe proprietatea de bază a diacetilului și anume pe volatilitate. Diacetilul dă reacție de culoare cu - alfa-naftolul și creatina. Prin comparația intensității colorației produse, cu o scară de culori, se poate determina cantitatea de diacetil din proba analizată.

Reactivi și materiale

- - Cameră Conway din sticlă (celule de microdifuziune)
- Plăcuțe de sticlă
- H_2SO_4 sol. 0,66 N
- Wolframmat de Na sol. 10%
- alfa-Naftol sol. 0,5% în NaOH 0,25 N (se prepară în momentul folosirii) (are stabilitate o oră)
- Creatină soluție apoasă 0,05%
- $CoSO_4 \cdot 7 H_2O$ soluție 0,1-10%

Tehnica de lucru

Într-o cameră Conway curată și uscată se introduc succesiv:

- în spațiul exterior:
 - 2 ml acid sulfuric sol. 0,66 N, 2 ml wolframmat de Na sol. 10% și 2 ml cultură de bacterii lactice sau distilat de cultură;
- în spațiul interior:
 - 0,75 ml alfa-naftol sol. 0,5% în NaOH sol. 0,25 N și 0,25 ml creatină sol. apoasă 0,05%.

Reactivii adăugați se amestecă prin mișcări de rotație ale camerei Conway, care apoi se acoperă etanș cu dop rotat și se incubează la 30°C, timp de 30 minute.

În cazul prezenței diacetilului lichidul din recipientul interior se colorează în roz. Intensitatea acestuia este proporțională cu

conținutul în diacetil al probei. Aprecierea se face prin recoltarea cu o pipetă curată a lichidului din spațiul interior al camerei și introducerea lui în eprubete curate (10/100 mm). Se compară apoi culoarea acestui lichid cu o scară de culori și se apreciază conținutul în diacetil, conform datelor din tabelul 31:

Tabelul 31

Date pentru stabilirea conținutului în diacetil

Concentrația etalonului de $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (%)	Conținutul în diacetil determinat prin tehnica microdifuziei (mg/l)
0,10	cca 0,1-urme (fără importanță pentru aromă)
0,25	0,2-0,5, conținut scăzut (aromă perceptibilă)
1,0	1-2, conținut mediu (aromă medie)
3,0	3-5, conținut ridicat (aromă intensă)
10	peste 7, conținut ridicat (aromă excesivă)

Pentru alcătuirea scării etalon se iau în eprubete de 10/100 mm câte 1,5 ml din fiecare soluție, apreciindu-se cantitatea diacetilului din probele analizate.

20.11. Determinarea conținutului în acizi volatili a culturilor lactice

Principiul metodei Distilatul se titrează cu NaOH 0,1 N, în prezența fenolftaleinei. Rezultatul se exprimă în ml NaOH 0,1 N folosiți la titrarea a 100 ml distilat.

Aparatură și reactivi

- Balon de distilare cu fund rotund de 750 ml
- Refrigerent Liebig 400
- Biuretă cu clemă Mohr
- Recipiente cotate de captarea distilatului
- H_2SO_4 sol. 5%
- NaOH sol. 0,1 N
- Fenolftaleină sol. alcoolică 2%

Tehnica de lucru

Într-un balon de distilare cu fund rotund se introduc 50 ml din cultura de analizat, 150 ml apă distilată și 3 ml acid sulfuric 5%. Se procedează la distilare prin antrenare cu vapori până se obțin 100 ml distilat. Se trece apoi la titrare a distilatului cu NaOH 0,1 N, în prezența indicatorului fenolftaleină. Se notează consumul de NaOH. Acesta este direct proporțional cu cantitatea de acizi volatili din cultura lactică analizată.

20.12.Determinarea conținutului de CO₂ din culturile lactice

Principiul metodei. Cantitatea CO₂ se exprimă calitativ prin volumul diferit al coagulului în funcție de temperatură.

Aparatură și materiale

- Baie de apă termoreglabilă
- Termometre
- Culturi lactice

Modul de lucru

Într-o eprubetă se introduc 20 ml cultură de analizat. Se închide apoi cu un dop de cauciuc. Se introduce într-o baie de apă la temperatura camerei, notându-se cu un marker nivelul la care se găsește coagulul. Se trece apoi la încălzirea treptată a apei din baie până la 90°C. Se notează și acum nivelul la care s-a ridicat coagulul. Rezultatele se redau în numărul de cm cu care s-a ridicat coagulul.

21 TEHNICI UTILIZATE ÎN BIOTEHNOLOGII

21.1. Metoda directă de numărare a drojdiilor, a sporilor de mucegaiuri cu ajutorul camerei de numărat (Thoma)

Camerele de numărat reprezintă lame de sticlă prevăzute cu 3 platforme, dintre care platforma centrală este denivelată față de celelalte două cu 0,10 mm. Platformele sunt separate între ele prin rigole în sticlă. Pe platforma centrală este gravată o rețea de linii perpendiculare care delimitează o anumită suprafață divizată de către linii în microcelule de formă pătratică. Se cunosc mai multe tipuri de celule de numărare cum ar fi: camera Thoma, Türk, Bürker, Rosenthal, Goreaev și altele, care sunt construite pe același principiu.

Camera Thoma, frecvent folosită la numărare, prezintă gravate pe ambele părți ale platformei centrale câte o rețea cu suprafața de 1 mm^2 divizată în 400 microcelule elementare, deci suprafața unei microcelule este de $1/400 \text{ mm}^2$. (vezi și fig.

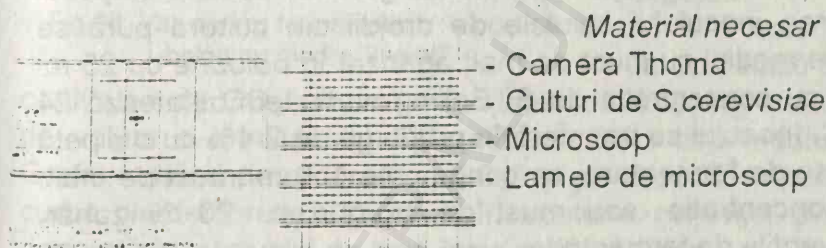


Fig.37. Camera Thoma

Tehnica de lucru

Se execută un preparat umed, plasând suspensia de celule pe suprafața rețelei. Se acoperă cu lamela, care sprijinindu-se pe cele două platforme laterale va delimita înălțimea stratului de lichid, egală cu adâncimea camerei (0,1 mm). Preparatul astfel obținut se fixează de platină cu cleme, iar cu ocular 10 x și obiectiv 45 x se caută imaginea rețelei. În câmpul microscopic, la grosiment 450, cu ajutorul platinei, se pot aduce grupe de câte 16 microcelule elementare și se face numărarea celulelor de drojdii cuprinse în grupul de 4×4 microcelule. Se exclud de la numărare celulele care se află cu mai mult de jumătate din suprafața celulei în exteriorul

cursului de 4x. Se fac numărări din mai multe câmpuri microscopice (minimum 10) și se calculează numărul mediu de celule dintr-o microcelulă. Cunoscând suprafața unei microcelule, precum și volumul său ($V = \frac{1}{400} \times \frac{1}{10} \text{ mm}^2$), în funcție de diluția folosită la numărare, se poate calcula numărul de celule prezente într-un ml de lichid de analizat cu ajutorul următoarei formule:

$$N = n \cdot 4000 \times 1000 \times k$$

unde

n = numărul mediu de celule pe microcelulă

4000 - volum microcelulă în mm^3

1000 - factor de transformare în ml (cm^3)

k - coeficient de diluție

21.2. Evidențierea fermentației alcoolice

Pentru studiul fermentației alcoolice și al factorilor care condiționează viteza de fermentare a zaharurilor fermentescibile se folosesc culturi pure de drojdii aparținând genului *Saccharomyces*. Pentru obținerea inoculului celulele de drojdii din cultura pură se transferă de pe mediul cu must de malț agarizat în baloane cu 25 ml must de malț cu concentrația de 6° Balling și se termostatează 24 ore la 25-30°C. Inoculul se transferă în proporție de 2-4% cu o pipetă sterilă în 3 vase de fermentare, ce conțin câte 150 ml must de malț, cu aceeași concentrație, sau must de struguri cu 20 % zahăr, prevăzute cu ventile de fermentație.

Material necesar

- Culturi de *S.cerevisiae*, tulpini selecționate respectiv tulpini locale
- Must de malț
- Must de struguri
- Vase de fermentație cu ventil
- H_2SO_4 conc.
- Balanțe de precizie
- Termostat reglat la 30°C

Vasele de fermentație (vezi fig.38), alcătuite din balonul propriu-zis și ventilul de fermentație, se spală bine și se usucă. Apoi se separă ventilul de fermentație de vasul de cultură. Se sterilizează ventilul prin autoclavare, la 120°C, 30 de minute. Vasul cu mediul de cultură se sterilizează separat prin autoclavare, la 110°C, 30 de minute. După răcirea vaselor, se montează ventilele de fermentație. Se introduce apoi prin orificiul superior al ventilului, o cantitate de acid sulfuric conc. Acesta va permite eliminarea CO₂ rezultat în timpul fermentației și va reține vaporii de apă și alte substanțe volatile. Se face cântărirea fiecărui vas la o balanță de precizie și apoi vasele de fermentație se termostatează la 30°C, timp de 3 zile.

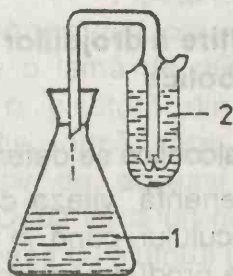


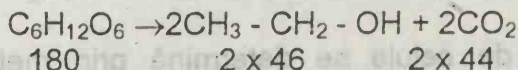
Fig.38. Vas pentru fermentație alcoolică
1-balon cu mediu; 2-ventil

La intervale de 6, 24, 48 și 72 ore, se face agitarea mustului pentru eliminarea CO₂ format, se execută cântărirea și se calculează prin diferență cantitatea medie de CO₂ degajată.

Viteza de fermentație se apreciază în funcție de cantitatea de CO₂ eliberat în unitatea de timp, raportată la unitatea de volum a mediului (g CO₂ eliberat de 1 litru mediu într-o oră). Grafic, notând pe ordonată g CO₂/l și pe abscisă timpul, se exprimă curba pierderilor de CO₂ de la începutul experienței, precum și cea degajată în intervalul de timp între două cântăriri.

La sfârșitul experienței, în mustul fermentat, se determină alcoolul etilic după distilare prin metoda picnometrică sau prin metoda oxidativă, bazată pe oxidarea alcoolului etilic la acid lactic și apă, în prezența bicromatului de potasiu și a acidului sulfuric.

Cantitatea de alcool etilic formată se poate calcula cu aproximație și prin conversia în alcool a pierderilor în CO₂ acumulate în perioada de fermentație, conform ecuației globale a fermentației alcoolice, fără să se țină seama de produșii secundari.



Din acest bilanț, se calculează:

$$A = Q_t \cdot 46/44 = 1,045 Q_t; \text{ g alcool absolut}$$

În același mod se poate calcula cantitatea de zahăr fermentat:

$$Z = Q_t \cdot 180/88 = Q_t \cdot 2,045, \text{ g zahăr fermentat.}$$

Se poate deduce și intensitatea, fermentației exprimată prin cantitatea de zahăr fermentat (Z_f) în procente față de zahărul inițial (Z_i), după un anumit interval de fermentație:

$$R = Z_f/Z_i \cdot 100$$

21.3. Determinarea vitezei de înmulțire a drojdiilor în timpul fermentației alcoolice

În paralel cu studiul fermentației alcoolice se determină, într-un vas paralel, în aceleași condiții de experiență, viteza de înmulțire a drojdiei studiate. După introducerea inoculului, când în mediu există o cantitate suficientă de oxigen, drojdiile produc oxidarea zaharurilor până la CO_2 și H_2O și are loc o înmulțire intensă. Apoi, procesul de respirație se reduce și se intensifică procesul fermentativ, iar celulele existente cresc în dimensiuni și în celulă se acumulează glicogen.

În ultimul stadiu al fermentației, drojdiile folosesc ca sursă de carbon trehaloză și glicogenul acumulat intracelular.

Pentru stabilirea vitezei de înmulțire se calculează coeficientul K_m , care exprimă numărul de celule noi ce se formează pentru fiecare celulă existentă, în timp de o oră, cu ajutorul formulei:

$$K_m = \frac{2,3(\log N_2 - \log N_1)}{t_2 - t_1}$$

unde:

N_1 = numărul inițial de celule introduse prin inocul sau existent la timpul t_1 al determinării;

N_2 = numărul de celule format în intervalul $t_2 - t_1$.

Numărul de celule se determină prin metode directe de numărare, de exemplu cu ajutorul camerei Thoma, la intervale de 5, 24, 48 și 72 ore și se determină valoarea vitezei de înmulțire.

21.4. Determinarea glicogenului în celule de drojdii

Observații privind acumularea glicogenului în celule permite aprecierea gradului de dezvoltare a culturii.

Material necesar

- Soluție Lugol pentru glicogen
- Lame de microscopie și lamele
- Culturi de drojdii pe mediu lichid
- Microscop
- Ulei de cedru
- Tavă de colorare
- Pipete Pasteur sterile

Tehnica de lucru

Pe o lamă de microscopie se pune cu ajutorul unei pipete Pasteur o picătură din cultura de drojdie sau din mediul de fermentație, după care se adaugă o picătură de soluție Lugol, aproximativ de aceeași mărime. Se amestecă puțin cele două picături. După circa un minut se aplică lamela. Excesul de lichid se îndepărtează cu ajutorul unei benzi de hârtie de filtru. Pe lamelă apoi se așează o picătură de ulei de cedru și se examinează la microscop cu ob. 90 x sau 100 x.

Celulele de drojdii în care este prezent glicogenul, vor prezenta intracelular incluziuni colorate în brun.

Pentru determinarea cantitativă, se recoltează din mediul de fermentație 1 ml de lichid de cultură, la acesta se adaugă 0,1 ml soluție Lugol și 0,9 ml apă distilată și după omogenizare se face numărarea cu ajutorul camerei Thoma. Din numărul total de celule se numără separat celulele care conțin glicogen, respectiv se determină numărul total de celule. Ținând cont de diluția efectuată se calculează procentual celulele cu glicogen la 1 ml de mediu de cultură, respectiv lichid de fermentație.

22. METODE DE INDUCERE ȘI IDENTIFICARE A MUTAȚIILOR LA MICROORGANISME

Mutațiile artificiale (orice schimbare în materialul genetic care determină un nou fenotip sau o funcție modificată) sunt induse la microorganisme pe cale experimentală de către agenții fizici, chimici și biologici.

22.1 Metode de inducere a mutațiilor cu radiații

Radiațiile neionizante (radiațiile ultraviolete) și cele ionizante (razele X = Röntgen, razele gamma) se utilizează cel mai frecvent pentru inducerea mutațiilor.

Inducerea mutațiilor cu ajutorul radiațiilor UV impune respectarea următoarelor condiții:

1. mediile de cultură în care are loc iradierea trebuie să fie lipsite de substanțe protectoare sau sensibilizante, respectiv de capacitate de fotoreactivare;
2. să se stabilească doza de iradiere în funcție de parametrii lămpii (eficiență maximă la circa 2580 Å);
3. să se stabilească curba de supraviețuire a tulpinii luate în studiu (cea mai bună doză este cea care asigură supraviețuirea a circa 25% din populația de celule).

Material necesar

- Lampă de UV (Universal UV - Lampe)
- Cultură de bacterii, cianobacterii, drojdii (aflată în faza staționară de creștere)
- Tampon fosfat de pH 7, soluție sterilă: soluție de Na_2HPO_4 0,2 M (72 ml) + soluție de KH_2PO_4 0,2 M (39 ml) Na_2HPO_4 0,2 M: 35,61 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + apă distilată ad. 1000 ml
- KH_2PO_4 0,2 M: 27,6 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + apă distilată ad. 1000 ml
- Volumul final (soluție a + soluție b), se stabilește prin completare cu apă dist. ad. 200 ml
- Cutii Petri sterile
- Centrifugă
- Piepete gradate sterile
- Medii nutritive adecvate sterile

Tehnica de lucru

Cultura tulpinii microbiene obținută pe mediu nutritiv adecvat se suspendă în tampon fosfat. Se centrifughează apoi 10 minute la

5000 rotații/minut (rpm). Sedimentul se resuspendă în tampon fosfat și se repetă centrifugarea la 5000 rpm timp de 10 minute.

Suspensia obținută, după cele două centrifugări, în soluție tampon se transpune în plăci petri sterile.

Lampa UV de laborator se pune în funcțiune cu o oră înainte, la o lungime de undă sterilizantă (225 nm). Apoi se deschid cutiile Petri așezate la o distanță de 50 cm față de sursa de UV. Se mențin expuse timp de 10, 20, 30, 40 minute. După iradiere cutiile Petri se acoperă cu hârtie neagră, pentru a împiedica fotoreactivarea. Se păstrează 30 de minute pentru a preveni și fotoreversia. Este necesar ca în timpul iradierii executantul să poarte ochelari de protecție.

Din fiecare probă (cutie Petri expusă un anumit timp) se fac însămânțări pe medii selective, pe medii complete, respectiv, pe mediul nutritiv + factorul de selecție (de ex. un antibiotic la care se așteaptă să se obțină o mutantă rezistentă la acesta).

Apoi cutiile Petri se introduc în termostat, la 30°C sau la 37°C. După 24 ore de incubare se calculează supraviețuirea și frecvența de apariție a mutațiilor.

Viabilitatea se calculează după formula:

$$\text{Viabilitatea (V\%)} = \frac{\text{Numărul de germeni/ml probă iradiată}}{\text{Numărul de germeni/ml probă neiradiată}} \cdot 100$$

Curba de supraviețuire se calculează în mod similar și pentru alte tipuri de radiații (raze gamma, raze X) ca de altfel și pentru substanțele chimice mutagene.

22.1.1. Tehnica de obținere a mutantelor rezistente la UV

Se aplică în cazul unor tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* de tip sălbatic (tulpini prototrofe) sau mutante auxotrofe pentru diferite baze azotate sau aminoacizi.

Material necesar

- Lampă de UV
- Tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* izolate de pe fructe, respectiv, diferite mutante auxotrofe
- Medii de cultură (Mediul YEPG, mediul YEPD, mediul de sporulare, mediu minimal)
- Centrifugă
- Apă distilată sterilizată
- Cuii Petri sterile
- Pipete gradate sterile

Tehnica de lucru

Se preapă mediile nutritive

Mediul YEPE

Extract de drojdie	10 g
Peptonă	20 g
Glucoză	20 g
Apă distilată	1000 ml

Se sterilizează la 110°C, 20 de minute.

Mediul YEPD

Extract de drojdie.	10 g
Bactopeptonă	20 g
Glucoză (dextroză)	20 g
Apă dist.	1000 ml

Se sterilizează la 110°C, 30 de minute.

Mediu de sporulare

Extract de malt.	1,8 g
Peptonă	3,0 g
Extract de drojdie	1,8 g
Glucoză	6 g
Apă dist.	600 ml
Agar	12 g

Se sterilizează la 110°C, 30 minute.

Mediu minimal Go

MgSO ₄ •7H ₂ O	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	6 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
FeCl ₃	0,002 g
Pantotenat de Ca	0,002 g
Tiamină	0,002 g
Inositol	0,002 g
Piridoxină	0,002 g
Acid nicotinic	0,0005 g

Se sterilizează la 110°C, 20 minute.

Tulpinile de drojdii sunt păstrate pe mediul YEPE înclinat (solidificat cu agar 2%). În momentul analizei tulpinile de drojdii sunt inoculate pe mediu YEPD lichid și sunt incubate 3 zile la 30°C, în condiții de agitare permanentă. Apoi sunt trecute în baloane de 50

ml, tot pe mediul YEPD, cu 10 ml/balon și incubate, în condiții de agitare permanentă, timp de 3 zile, la 30°C.

Cultura obținută se centrifughează, la 4000 rotații/minut, timp de 30 minute. Se îndepărtează supernatantul și se spală de două ori cu apă distilată sterilă. Se centrifughează a doua oară, tot la 4000 rotații/minut, timp de 30 minute. Apoi se suspendă sedimentul în 10 ml tampon fosfat de pH=7, la care se adaugă 0,3 ml etilmetansulfonat. Se agită bine, apoi se introduce în termostat, la 30°C pentru o oră. Viabilitatea celulelor tratate cu etilmetansulfonat este de circa 10%.

Se centrifughează la 4000 rpm, 30 de minute. Se spală cu apă distilată sterilă. Se decantează. Se menține apoi 15 minute într-o soluție de tiosulfat de Na 6%. După aceasta se spală de 2-3 ori cu apă distilată sterilă, îndepărtându-se de fiecare dată supernatantul. Din sediment se prepară diluții în mediul YEPD steril. Se însămânțează apoi diluțiile în cutiile Petri, pe mediu YEPD complet. Coloniile formate, după 3 zile de incubare la 30°C, se transferă pe mediu minimal și se expun acțiunii radiațiilor UV(200 ergi/mm²). Durata expunerii: 5-40 minute. Se acoperă apoi culturile cu pânză neagră. Se introduc în termostat, la 30°C, pentru 24 ore. Pe medii solide (YEPG) se dezvoltă numai mutantele rezistente la UV. În continuare, mutantele obținute sunt analizate complex, urmărindu-se diferențierea lor de tulpinile martor prin modificarea activității enzimatică, respectiv prin modificarea intensității fermentației alcoolice.

22.2. Metode de inducere a mutațiilor cu substanțe chimice

Cel mai adesea se folosește acidul azotos, dar pot fi utilizate și alte substanțe chimice de ex. (N-metil nitrosamide, coloranți, antibiotice, antifungice, clorură de Co, clorură de Ni, bromură de etidiu etc.).

Pentru a controla mutageniza indusă de acidul azotos se iau în considerație 3 factori : 1. populația de celule, 2. concentrația agentului mutagen și 3. timpul de acțiune.

Material necesar

- Lampă de UV
- Cultură de bacterii, cianobacterii, drojdii (aflată în faza staționară de creștere)
- Nitrit de Na soluție 4 M

- NaOH soluție 10%
- Acid acetic 10%
- Tampon fosfat de pH=7, soluție sterilă
- Cutii Petri sterile
- Pipete gradate sterile
- Medii nutritive adecvate

Tehnica de lucru

Acidul azotos fiind instabil în natură se obține în laborator din sărurile sale (NaNO_2 , KNO_2) prin tratare cu un acid).

Azotitul de Na se prepară în ziua efectuării experiențelor. În eprubete se introduc 5 ml azotit de Na soluție 4 M, apoi 0,1 ml NaOH 1% și 0,1 ml acid acetic. După câteva minute apar bule de gaz, care indică prezența acidului azotos. În continuare din acest amestec se iau 2 ml și se introduc într-o eprubetă, care conține deja 2 ml cultură bacteriană. Vor exista mai multe eprubete în care se va urmări efectul mai multor durate de tratament (1-40 minute). După trecerea timpului de tratament stabilit, se adaugă 4 ml soluție tampon fosfat pentru neutralizarea acidului azotos și în același timp pentru stoparea mutagenzei. Acidul azotos poate fi mai concentrat dacă se adaugă în plus acid acetic. Efectul mutagen este proporțional cu concentrația de acid azotos în stare născândă, respectiv cu durata tratamentului.

După neutralizarea amestecurilor se fac însămânțări (0,1 ml) în cutii Petri în care s-a turnat geloză simplă. Din culturile apărute se fac apoi însămânțări pe mediu minimal suplimentat cu diverși factori de creștere (aminoacizi, vitamine, baze azotate), în diferite combinații, pentru identificarea mutantelor auxotrofe. Pentru izolarea mutantelor se pot utiliza mai multe metode: metoda dispersiei, metoda replicii, metoda chemostatului, metoda fluctuației.

Vom descrie sumar aceste tehnici.

Metoda dispersiei (Newcombe, 1994) permite identificarea și izolarea mutantelor rezistente la antibiotice, bacteriofagi, radiații etc. Bacteriile inițiale sau de tip sălbatec se cultivă pe bulion nutritiv. Apoi se transferă pe mediul bulion nutritiv gelozat în cutii Petri. Din coloniile apărute după incubare la 37°C , timp de 18-22 ore se prepară diluții zecimale în bulion nutritiv, din care se vor dispersa pe alte cutii Petri cu bulion nutritiv gelozat ce conțin un antibiotic (streptomycină, penicilină, tetraciclină). Pe aceste plăci se vor forma colonii rezistente la antibioticul respectiv.

Metoda replicii (elaborată de Lederberg în 1952) dă posibilitatea izolării mutantelor în absența factorilor selectivi din mediu (antibiotice, bacteriofagi etc.)

Se utilizează rondele de catifea, cu suprafața aproximativ egală cu cea a unei cutii Petri ($\phi 10$ cm). Se montează pe un suport cilindric (pahar Borrel sau Berzelius (fixându-se cu un inel metalic, se împachetează în hârtie și se sterilizează prin autoclavare (120°C , 60 minute).

Bacteriile de studiat se cultivă la 37°C , pe bulion nutritiv gelozat. După apariția coloniilor, placa Petri se deschide lângă flacăra unui bec de gaz și se așează cu gura în jos peste dispozitivul cu rondela de catifea sterilă. Se presează ușor, în așa fel ca toate coloniile să se imprime pe rondela de catifea. Apoi, alte plăci cu mediu solid sterile se așează în același mod peste rondela de catifea, presându-se ușor. În acest mod celulele fiecărei colonii care s-au dezvoltat pe placa Petri inițială, sunt aranjate în același mod pe noile plăci fără a fi perturbate relațiile lor spațiale, demonstrându-se că apariția clonală a mutațiilor bacteriene are loc spontan și independent de condițiile de mediu. Această tehnică permite obținerea aceluiaș număr de colonii, cu aceeași dispoziție topografică. Prin tratarea celulelor bacteriene (respectiv algale, fungice) prototrofe (de tip sălbatec) cu factori mutageni fizici sau chimici, pot rezulta mutante auxotrofe care pot fi identificate pe mediul minimal sau complet din care lipsesc unul sau mai mulți factori de creștere (aminoacizi, vitamine, baze azotate). După incubare se poate demonstra că de ex. o mutantă auxotrofă pentru adenină nu se va dezvolta pe mediul minimal sau pe cel complet lipsit de adenină.

Metoda chemostatului

Chemostatul (un aparat pentru obținerea culturilor continue) permite depistarea unei mutații apărute, pe măsură ce numărul descendenților crește progresiv, fiind scurtat timpul necesar multiplicării bacteriilor (aflându-se timp de mai multe generații în faza exponențială de creștere).

Metoda fluctuației (elaborată de Luria și Delbrück, 1943) permite izolarea mutantelor bacteriene rezistente la bacteriofagi, radiații etc. Cultura bacteriană (*E.coli*) sensibilă la bacteriofagi se împarte în două loturi. Un lot se transferă într-un balon cu mediu nutritiv, lichid, iar al doilea este reprezentat de 15 eprubete cu 0,5 ml. După 24 ore de incubare la 37°C se însămânțează fiecare lot pe 15 plăci Petri cu bulion nutritiv gelozat în care se găsește încorporat un bacteriofag (de ex. T_2). Se pun apoi plăcile Petri la incubat în termostat (24 ore la 37°C sau 48-72 ore). După incubare se constată

că numai mutantele spontane rezistă la bacteriofag și formează colonii. Comparând numărul de colonii mutante apărute spontan la cele două loturi se poate calcula frecvența apariției atât a celor spontane cât și a celor induse (de diferiți agenți mutageni fizici sau chimici).

22.3. Tehnici de obținere și fuziune a protoplaștilor la microorganisme

Protoplaștii (protoplastele) reprezintă modele experimentale pentru studii de biologie celulară și moleculară, deschizând direcții noi de cercetare în domeniul geneticii microorganismelor oferind o serie de avantaje în obținerea unor microorganisme înalt producătoare de substanțe biologic active folosite în biotehnologii.

După descoperirea polietilen-glicolului [$\text{HOCH}_2 - (\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n \text{CH}_2\text{OH}$] ca agent de fuziune a protoplaștilor (Anné și Peberdy, 1975) o serie de cercetători au realizat fuziunea protoplaștilor la bacterii (Fodor și Alföldi, 1976), la streptomicete (Hopwood și colab., 1977), drojdii (Böttcher și colab., 1979).

22.3.1. Obținerea protoplaștilor bacterieni

S-a demonstrat la mai multe specii de *Bacillus*. Weibull (1953) a izolat protoplaști la *Bac. megaterium*, cu ajutorul lizozimului. În 1968, Landman și colab. au arătat că protoplaștii de *Bac. subtilis* pot reveni la forma inițială (bacilară). Regenerarea protoplaștilor bacterieni necesită parcurgerea a 3 etape importante:

1. refacerea peretelui celular,
2. creșterea protoplastului,
3. reversia protoplastului la forma inițială (celule numite revertanți).

Material necesar

- Culturi bacteriene de *Bacillus* sp. crescute pe geloză înclinată
- Mediu nutritiv lichid
- Tampon fosfat 0,1 M
- Lizozim
- Zaharoză soluție 0,4 M
- Microscop
- Pipete gradate sterile

Tehnica de lucru

Se prepară un mediu nutritiv cu următoarea compoziție: glucoză 1 g, extract de drojdie 0,4 g, peptonă 0,4 g, KH_2PO_4 0,2 g, Na_2HPO_4 0,4 g, MgSO_4 0,005 g, apă distilată 100 ml, pH 7,2. Se sterilizează în autoclav la 110°C , 20 minute. Tulpina de *Bacillus* se trece pe acest mediu și se incubează 18 ore la 30°C . Din aceasta se fac diluții seriate în tampon fosfat, pentru obținerea unei densități optime lizei peretelui celular. Obținerea protoplaștilor se realizează

prin tratarea celulelor cu soluție enzimatică (tampon fosfat 0,4 M, lizozim 100 $\mu\text{g/ml}$, zaharoză 0,4 M) la 30°C, 2 ore. Apariția protoplaștilor se urmărește la microscop.

22.3.2. Obținerea protoplaștilor de drojdii

Procedeele de obținere a protoplaștilor de drojdii se împart în 3 grupe:

1. procedee mecanice sau autolitice
2. procedee de inhibare specifică a sintezei peretelui celular și
3. procedee de digestie enzimatică a peretelui celular cu enzime din suc digestiv de *Helix pomatia*, cu enzime bacteriene (de la *Arthrobacter luteus*) cu endo- β -(1/3)-glucanază de origine fungică, respectiv cu chitinază de *Oerskovia*.

Material necesar

- Culturi de *Saccharomyces* pe mediu YEPD (tulpini auxotrofe)
- Soluție pentru obținerea protoplaștilor cu următoarea compoziție: 1 ml tampon [Tris-HCL 0,05 M, pH 7,5-(Tris (hidroximetil aminometan) 0,2M: 24,2g /100ml H₂O dist. (50 ml) +41,4 ml HCl 0,2 M + apă dist. ad 200 ml] 0,2 ml 2-mercaptoetanol 1 M + 6 ml soluție de KCl 1,2 M și Mg SO₄ 0,02 M (folosite în proporții egale) + 0,5 ml suc digestiv de melc (*Helix pomatia*).
- Soluție tampon fosfat 0,02 M, pH 7, suplimentată cu KCl 0,6 M și CaCl₂ 0,1 M
- Soluție de PEG (polietilenglicol) 4000 35%(g/v) cu CaCl₂ 0,1 M
- Pipete gradate sterile
- Mediu minimal agarizat, suplimentat cu leucină, respectiv cu adenină.
- Cutii Petri sterile

Tehnica de lucru

Se obțin culturi de *S. cerevisiae* pe mediu YEPD, tinere (incubate 18 ore la 30°C). La 5 ml cultură tânără (aflată în faza logaritmică de creștere) se adaugă 7 ml soluție de protoplastizare. Se ține amestecul 2 ore la 30°C. Se spală sedimentul prin centrifugare cu tampon fosfat steril, de două ori. Se centrifughează. Se suspendă sedimentul în PEG 4000. Se incubează 20 minute la 30°C. Apoi se iau probe pentru regenerare. Pentru regenerare se ia 0,1 ml din amestecul de protoplaști și se introduc într-o cutie Petri sterilă. Se adaugă apoi 0,5 ml tampon fosfat. Se omogenizează. Se adaugă apoi mediu minimal agarizat lichefiat și răcit la 45°C. Se analizează apariția coloniilor pe mediu minimal, fapt ce evidențiază fuziunea protoplaștilor celor două tulpini parentale auxotrofe.

23. PĂSTRAREA ȘI CONSERVAREA CULTURILOR

Pentru menținerea și păstrarea culturilor microbiene timp îndelungat s-au elaborat mai multe metode.

23.1. Reinocularea periodică

Se recomandă ca reinocularea pe medii proaspete să se efectueze la interval de circa 3 luni pentru a se evita uscarea (dehidratarea) mediilor și pentru a se înlătura acțiunea dăunătoare a produșilor de metabolism acumulați în vasele de cultură. Dezavantajul metodei constă în posibilitatea infectării, fiind relativ des reinoculate, respectiv în posibilitatea modificării unor proprietăți morfologice și fiziologice. De asemenea, prezintă dezavantajul că nu se reduce timpul de lucru. Culturile se păstrează la 4°C.

23.2. Păstrarea în vase închise ermetic

Se păstrează culturile microbiene în vase închise cu dopuri de vată parafinate pentru a preveni uscarea mediilor. În aceste cazuri păstrarea poate dura circa un an, la 4°C.

23.3. Păstrarea în ulei mineral

Culturile de microorganisme crescute pe mediu cu agar se acoperă cu ulei mineral (ulei de parafină) sterilizat. Acest lucru permite apărarea culturii împotriva uscării și infectării. Culturile se păstrează în frigider sau la temperatura laboratorului timp de 7-14 luni.

23.4. Păstrarea prin liofilizare

Metoda se pretează pentru păstrarea bacteriilor, drojdiilor și micromicetelor. Proprietățile fiziologice nu sunt alterate.

Bacteriile se suspendă în lichid stabilizator, cu efect protector. Pentru liofilizare se recomandă folosirea culturilor de 18-24 ore, din care se prepară suspensii celulare cu densitate de 10^9 - 10^{15} celule/ml. Ca lichid stabilizator se recomandă bulionul nutritiv, laptele degresat 10%, serul și albumina 1-10%, gelatina 1-10%, peptona 5%, glucoza 5-10%, zaharoza 5-10%, glutamatul de sodiu 1%.

Bacteriile suspendate în lichidul stabilizator se introduc în condiții aseptice în ampule de sticlă groasă sterile. Apoi se congelează brusc în amestec de alcool și zăpadă carbonică (la -70°C) sau în azot lichid, respectiv în criostat. Bacteriile congelate sunt supuse la un vid înalt. Produsul final al liofilizării este o pulbere cu mare afinitate pentru lichide (gr.lio = lichid; filein = a atrage). Probele liofilizate se păstrează la 4°C . Termen de conservare: câțiva ani.

Recultivarea microorganismelor se realizează pe medii nutritive specifice. Fiolele cu produsul liofilizat se dezinfectează cu alcool. Se taie cu pila. La flacără, se introduce cu o pipetă Pasteur sterilă circa 0,2 ml apă distilată sterilă sau bulion nutritiv steril. După agitare, suspensia relativ omogenă se extrage cu aceeași pipetă Pasteur și se inoculează pe medii nutritive adecvate sterile. După o incubare la $30-37^{\circ}\text{C}$ timp de 24-48 ore, se efectuează controlul purității culturii.

Colecții de tulpini bacteriene

Există mai multe centre naționale și internaționale care dețin colecții de tulpini bacteriene. Amintim câteva dintre cele mai importante.

- AMNH - American Museum of Natural History, New York
- ATCC - American Type Culture Collection, Rockville, Maryland
- CCEB - Culture Collection of Entomogenous Bacteria, Prague
- CCTM - Centre de Collection de Types Microbiens, Lausanne
- CIP - Colection de l'Institut Pasteur, Paris
- IC - Institutul Cantacuzino, București (v. tabelul 32)
- IEM - Institut Epidemiologii i Mikrobiologii, Moskva
- ICA - Institutul de Cercetări Alimentare, București
- NCTC - National Collection of Type Cultures, London
- OKI - Országos Közegészségügyi Intézet, Budapest
- PHLS - Public Health Laboratory Service, London
- Colecțiile de culturi din străinătate pot fi abordate prin intermediul lui "International Center for Information and Distribution of Type Cultures" din Lausanne, Switzerland, 19 Avenue Cesar Roux, 1000 Lausanne.

Tabel 32

Colecția de culturi microbiene a Institutului Cantacuzino

Nr.crt	Tulpina microbiană	Nr. de colecție
	<i>Tulpini bacteriene</i>	
1	Arizona hinsawii	13024
2	Citrobacter freundii	11981
3	Clostridium perfringens	12182
4	Clostridium sporogenes	12213
5	Escherichia coli	13203
6	Escherichia coli O ₂₆ B ₆	10190
7	Escherichia coli O ₅₅ B ₅	12070
8	Escherichia coli O ₁₁₁ B ₄	10192
9	Klebsiella pneumoniae	13420
10	Klebsiella pneumoniae	12341
11	Klebsiella pneumoniae	11515
12	Proteus mirabilis	12025
13	Proteus morganii	10430
14	Proteus rettgeri	10433
15	Proteus vulgaris	12025
16	Providencia sp.	12060
17	Pseudomonas aeruginosa	10451
18	Pseudomonas aeruginosa	13202
19	Salmonella enteritidis	10869
20	Salmonella typhi	10734
21	Salmonella typhi tip fagic A	10779
22	Salmonella typhimurium	10613
23	Shigella flexneri "2a"	13206
24	Shigella sonnei faza II	11196
25	Staphylococcus aureus "Oxford"	10275
26	Staphylococcus aureus "Wood"	10266
27	Staphylococcus aureus	13204
28	Streptococcus pyogenes	11467
29	Streptococcus grup B	11371
30	Streptococcus grup C	12262
31	Streptococcus grup D	12251
	<i>Tulpini fungice</i>	
1	Aspergillus niger	106
2	Candida albicans	130
3	Candida brumptii	101
4	Candida guilliermondii	184
5	Candida krusei	190
6	Candida parapsilosis	147
7	Candida pseudotropicalis	150
8	Candida tropicalis	133
9	Cryptococcus neoformans	232
10	Torulopsis glabrata	233

BIBLIOGRAFIE

1. Aaronson, S.: *Experimental Microbial Ecology*. Queens College, Flushing, New York, 1970.
2. Alef, K., Nannipieri, P.: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Acad. Press, Harcourt Bruce Comp. Publishers, London, 1995.
3. Alteraş, I. şi colab.: *Metodele laboratorului clinic*. Edit. Medicală, Bucureşti, 1964.
4. Anghel, I. şi colab.: *Genetica microorganismelor. Principii şi tehnici de laborator*. Univ. Bucureşti, 1985.
5. Benson, J. H.: *Microbiological applications. A laboratory manual in general microbiology* Wm. C. Brown Publishers, Dubuque 1990.
6. Bica-Popii, V., Răducănescu, H.: *Microbiologie şi imunologie veterinară. Lucrări practice*. Edit. Did. Pedag., Bucureşti, 1966.
7. Board, R. G., Lovelock, D. W.: *Some methods for microbiological Assay*. University of Bath, H. J. Heinz Ltd, Hayes, Middlesex, 1987.
8. Bradshaw, L. J.: *Laboratory microbiology*. Saunders Co., Philadelphia, 1964.
9. Bradshaw, L. J.: *Laboratory immunology*. Saunders College Publishing, Philadelphia, 1994.
10. Bridson, E. Y.: *The Oxoid Manual*. 7th edn. Alphaprint, Alton Hants. 1995.
11. Buiuc, D., Neguţ, M.: *Tratat de microbiologie clinică*. Partea a VI-a, p. 994-1207. Edit. Medicală, Bucureşti, 1999.
12. Collins, C. H.: *Microbiological methods*. Butterworths, London, 1967.
13. Colowick, S. P., Kaplan, V. D.: *Methods in enzymology*. Vol. II Acad. Press, Inc., New York., 1955.
14. Condrea, P. şi colab.: *Lucrări practice de microbiologie*. Edit. Medicală, Bucureşti, 1959.
15. Constantinescu, O.: *Metode şi tehnici în micologie*. Edit. Ceres. Bucureşti, 1974.
16. Dickscheit, R., Janke, A.: *Handbuch der microbiologischen Laboratoriumstechnik*. Verlag Theodor Steinkopff, Dresden, 1969.
17. Difco: *Difco Manual. Dehydrated cultural media and reagents for microbiology*. 10th edn, Difco laboratories, Detroit, 1996.
18. Drews, G.: *Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler*. Springer-Verlag, Berlin, 1968.

19. Edwards, C.: *Methods in biotechnology. 12. Environmental monitoring of bacteria*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999.
20. Ejoy, T.I.: *Rukovodstvo k practiceskim zaniatiam po selskohozaistvennoi mikrobiologhii*. Vâșșaia șkola, Moskva, 1974.
21. Fresenius, W., Quentin, E. K., Schneider, W. (Eds.) *Water analysis*. Springer Verlag Berlin, 1988.
22. Gerhardt, Ph. și colab., *Manual of methods for general bacteriology*. Am.Soc. Microbiology, New York, 1981.
23. Harrigan, F.W., McCance, E.M., *Laboratory methods in food and dairy microbiology*, Acad. Press, London, 1976.
24. Hulea, A., *Ghid pentru laboratoarele de micologie și bacteriologie*, Edit. Agrosilvică, București, 1969.
25. Ivanof, A., *Lucrări practice de microbiologie*. Litografia I.M.F., Cluj-Napoca, 1983.
26. Larpent, J.P., Larpent-Gourgau, M., *Manuel pratique de microbiologie*, Edit.Hermann, Paris, 1985.
27. Levett, P.N., *Anaerobic Microbiology. A Practical Approach*. Oxford Univ.Press, 1991.
28. Merck, *Microbiologisches Handbuch*, E. Merck, Darmstadt, 1998.
29. Miller, J.M., Wentworth, B.B., *Methods for quality control in diagnostic microbiology*, Am.Public Health Association, New York 1985.
30. Pochon, J., *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*, Édit. Masson, Paris, 1954.
31. Pochon, J., Tardieux, P., *Téchniques d'analyses en microbiologie du sol*, St.Mande, Paris, 1962.
32. Pramer, D., Schmidt, E.L., *Experimental soil microbiology*, Burgess Publishing Co., Minneapolis Minnessota, 1965.
33. Rodina, A.G., *Metoda vodnoi mikrobiologhii*. Prakticeskoe rukovodstvo, Izd.-vo Nauka, Moskva, 1965.
34. Rodina, A.G., *Methods in aquatic microbiology*, Univ. Park Press, Baltimore, Butterworths, London, 1972.
35. Schinner, F. și colab., *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*, Springer Verlag, Berlin, 1993.
36. Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R., (Eds.), *Methods in soil biology*, Springer Verlag, Berlin, 1996.
37. Zarnea, G. și colab., *Principii și tehnici de microbiologie generală*, Vol.I, Tipografia Univ. București, 1992.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

01003502

48.000 lei